

**GISELLE BURLAMAQUI KLAUTAU**

**COMPARAÇÃO DO TESTE TUBERCULÍNICO  
COM O ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE INTERFERON GAMA (IGRA)  
PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO LATENTE PELO  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E DA TUBERCULOSE DOENÇA  
EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV/AIDS**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.

São Paulo  
2014

**GISELLE BURLAMAQUI KLAUTAU**

**COMPARAÇÃO DO TESTE TUBERCULÍNICO  
COM O ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE INTERFERON GAMA (IGRA)  
PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO LATENTE PELO  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E DA TUBERCULOSE DOENÇA  
EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV/AIDS**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.

**Orientadora:**

Profa. Dra. Denise do Socorro da Silva  
Rodrigues

São Paulo  
2014

Klautau, Giselle Burlamaqui

**Comparação do teste tuberculínico com o ensaio de liberação de interferon-gama (IGRA) para detecção da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* e da tuberculose doença em pacientes infectados pelo HIV/AIDS** / Giselle Burlamaqui Klautau. – São Paulo, 2014. xxvii, 151f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Infectologia.

Título em inglês: Interferon-gamma release assay (IGRA) compared to tuberculin skin test for detection of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection and tuberculosis disease in HIV-infected/AIDS patients.

1. *Mycobacterium tuberculosis* 2. Teste Tuberculínico/métodos 3. Testes de Liberação de Interferon-gama/métodos 4. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. 5. Tuberculose Latente/diagnóstico.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**  
**DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA**

Chefe do Departamento:

**Profa. Dra. Maria Teresa Zanella**

Chefe da Disciplina de Infectologia:

**Prof. Dr. Celso Francisco Hernandes Granato**

Coordenador do Curso de Pós-graduação:

**Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz**

**GISELLE BURLAMAQUI KLAUTAU**

**COMPARAÇÃO DO TESTE TUBERCULÍNICO  
COM O ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE INTERFERON GAMA (IGRA)  
PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO LATENTE PELO  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DA TUBERCULOSE DOENÇA  
EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV/AIDS**

Presidente da Banca Examinadora:

Profa. Dra. Denise do Socorro da Silva Rodrigues

---

Titulares:

Profa. Dra. Marinella Della Negra

---

Profa. Dra. Maria Isabel de Moraes Pinto

---

Prof. Dr. Roberto Stirbulov

---

Prof. Dr. Sidney Bombarda

---

Suplentes:

Prof. Dr. Nilton José Fernandes Cavalcante

---

Prof. Dr. Milton Soibelman Lapchik

---

## Dedicatória

*Aos meus pais,  
María Luíza e Zuza,  
pelo exemplo de conduta  
ética que jamais esqueceremos.*

*Aos meus queridos irmãos,  
André, Ângela, Eliza e Tiago,  
pelo intenso amor que nos une.*

*Ao Caetano,  
pelo apoio incondicional  
a todos os meus projetos.*

*Aos meus filhos,  
Mateus e Marina,  
por representarem o maior  
estímulo para o crescimento acadêmico.*

*À Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina.*

*À Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.*

*À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.*

*Ao Instituto de Infectologia Emílio Ribas.*

*Ao Instituto Clemente Ferreira.*

## **Agradecimentos**

À Profa. Dra. Denise da Silva Rodrigues, que com competência me orientou no desenvolvimento desse trabalho, criando uma relação acadêmica, de amizade e respeito.

À Nadijane Valéria Ferreira, bióloga, pela ajuda na realização do IGRA, com extremo cuidado em todas as etapas, sempre disponível. Aprendi muito com você.

Ao Nelson e ao Gerson do IIER, enfermeiros que coletaram cuidadosamente as amostras de sangue dos pacientes do IIER, etapa muito importante do teste, sempre dispostos a ajudar.

À Regina Castro Reis, pelo apoio desde as fases iniciais do projeto com competência e dedicação.

Aos funcionários do Laboratórios de Imunologia do Prof. Dr. Reinaldo Salomão (UNIFESP), pela delicadeza e disponibilidade, especialmente à Milena pela atenção e ajuda na realização do ELISA.

Ao Prof. Dr. Marcelo Nascimento Burattini, pelas valiosas sugestões na metodologia, sempre disposto a ajudar apesar de seu tempo tão curto.

Ao Dr. Jorge Afiune, pela ajuda e sugestões nas avaliações radiológicas no conhecer de quem chegou antes.

Aos profissionais do Instituto Clemente Ferreira, pelos anos de convivência, atenção e carinho que me dispensaram, jamais esquecerei a riqueza das reuniões clínicas do ICF.

Aos pós-graduandos da laboratório de imunologia do ICF, Priscilla, Telma, Fabíola, Emerson e Lucas pela parceria nas atividades diárias do laboratório, tornando nossa convivência agradável e harmoniosa.



À Cleusa do laboratório do ICF, sempre delicada e atenciosa durante a realização do experimento.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Fiuza de Melo (*in memoriam*), quantas e quantas vezes lembrei-me de você durante esse trabalho, como gostaria de ouvir suas críticas, ideias e sugestões, sempre um entusiasta das pesquisas no campo da tuberculose. Os profissionais de saúde, a doença, o ICF e os tuberculosos sempre sentirão sua falta.

Aos funcionários da sala de vacinas do IIER, pela realização do teste tuberculínico, especialmente à Profa. Dra. Tânia Chaves que participou das fases iniciais do estudo.

Ao Prof Dr. Ricardo Helbert Bammann, Cirurgião do IIER, que com grande interesse ajudou na realização das biópsias, demonstrando sempre grande entusiasmo nas pesquisas no terreno da tuberculose.

Aos profissionais do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, que com muita presteza encaminharam os pacientes para a realização do estudo.

Aos amigos do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Profa. Dra. Marinella Della Negra, Dr. Wladimir Queiroz, Dra. Yu Ching Lian, Dra. Denise Pacola, Dr. Robério Carneiro Jr., Márcia Giorgi e Maria Rosa Pereira, pela ajuda e compreensão sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao amigo Mário Gonzalez, pela parceria nas pesquisas em infectados pelo HIV e pela amizade incondicional.

Ao Prof. Dr. Valdir Golin, Diretor da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pela confiança e estímulo, construindo uma relação de respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Conceição Lima, Diretor do Departamento de Medicina da Santa Casa de São Paulo, minha gratidão pelo estímulo e compreensão, fundamentais para conclusão do estudo.

À Profa. Dra. Tuba Milstein Kuschnaroff, pelo constante incentivo para a elaboração deste trabalho e pelo grande exemplo de um verdadeiro professor.

Ao amigo Mauro Salles, pela amizade de toda vida, um árduo incentivador para realização deste estudo.

Ao amigo Rodrigo Contrera do Rio, pela ajuda nas atividades diárias na Santa Casa e pela bela relação de respeito e amizade de todos esses anos.

Ao Vasco, pelo carinho e apoio de todos os anos de convivência.

Aos amigos do Departamento de Medicina:

Prof. Dr. José Flávio Castteluccio, Prof. Dr. Zied Rasslan, Prof. Dr. Renato Moraes Alves Fabbri, Prof. Dr. Milton Luiz Gorzoni, Prof. Dr. Irineu Massaia, Profa. Dra. Renata Telles Rudge de Aquino e Profa. Dra. Maria Elisa Magliari, pela parceria que tornam nossos dias maiores e melhores.

Aos amigos do Pronto-socorro Central da Santa Casa onde tudo começou:

Profa. Dra. Sandra Regina Sprovieri, Profa. Dra. Aida Suozzo, Dr. Afonso Celso Pereira, Dr. Paulo Roberto Azevedo, pela ajuda no recrutamento de pacientes e por todos esses anos de convivência maravilhosa.

À Cely Barreto da Silva, Ana Paula Idalgo da Fonseca Souza e Gláucia Megumi Kagajoda da ISCMSP, que diariamente enviavam os resultados de possíveis pacientes para pesquisa.

Ao Prof. Dr. Silas Pereira Barbosa Júnior, pela presteza e ricas ideias, sempre com uma palavra de incentivo e tranquilidade.

Ao Michel e a Érica, pela paciência interminável em explicar-me as análises estatísticas, sempre com um sorriso a cada retorno.

Aos pacientes que concordaram em participar deste estudo, ensinando-me que é possível ser feliz apesar da associação de doenças tão estigmatizadas.

À FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro para realização do estudo.

Para realização de uma pesquisa além daqueles que estão diretamente envolvidos no estudo, muitas outras pessoas participam, aqueles que durante nossa ausência trabalham dobrado, aqueles que dedicam seu tempo para recrutar e encaminhar pacientes para o estudo e para dar opiniões valiosas sobre a pesquisa, enfim agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização desse estudo.

## Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos .....	vii
Lista de figuras .....	xv
Lista de quadros .....	xvii
Lista de tabelas .....	xviii
Lista de abreviaturas .....	xxiv
Resumo.....	xxvi
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Infecção Latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (ILTB) .....	3
1.1.1 Desafios no diagnóstico da ILTB.....	3
1.2 Risco de adoecimento por tuberculose.....	4
1.3 Diagnóstico da ILTB .....	8
1.3.1 Teste Tuberculínico (TT) .....	8
1.3.1.1 Interpretação do teste tuberculínico, detecção de ILTB e indicações de tratamento.....	10
1.3.1.2 BCG e teste tuberculínico.....	12
1.3.1.3 TT e o Fenômeno de hipersensibilidade tardia (HST).....	13
1.3.2 Ensaio de Liberação de Interferon Gama (IGRA) .....	14
1.3.2.1 O IGRA no diagnóstico da ILTB e da TB doença .....	19
1.3.2.2 Impacto da depleção de linfócitos T CD4+ no resultado do IGRA.....	22
1.3.2.3 Resultado indeterminado do IGRA.....	22
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 Casuística.....	28
3.1.1 Critérios de elegibilidade .....	28
3.1.2 Critérios de exclusão .....	28
3.2 Cálculo do tamanho da amostra .....	29
3.3 Seleção da amostra .....	29
3.4 Definição do risco de infecção latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (ILTB) e de tuberculose doença .....	31
3.4.1 Definição de risco de ILTB.....	31
3.4.2 Definição da ILTB .....	33
3.4.3 Diagnóstico da tuberculose doença .....	33
3.5 Procedimentos.....	34
3.5.1 Questionário.....	34

3.5.2 Procedimentos diagnósticos.....	35
3.5.2.1 Teste tuberculínico .....	35
3.5.2.2 Ensaio de Liberação de Interferon Gama (ELIG/IGRA) .....	35
3.5.2.3 Sorologia anti-HIV.....	36
3.5.2.4 Estudo radiológico do tórax .....	37
3.5.2.5 Baciloscopia de escarro .....	37
3.5.2.6 Exame anatomopatológico (AP).....	38
3.6 Conduta após o resultado do TT e do IGRA .....	38
3.7 Ética e Comitês de Ética em Pesquisa.....	39
3.8 Instituições participantes .....	39
3.9 Análise estatística.....	39
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 Análise dos resultados do grupo 1 composto por 90 pacientes infectados pelo HIV sob risco de infecção latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (ILTB).....	42
4.1.1 Análise descritiva .....	42
4.1.1.1 Variáveis quantitativas .....	42
4.1.1.2 Variáveis qualitativas .....	42
4.1.2 Teste Tuberculínico (TT) e Ensaio de Liberação de Interferon gama (IGRA) ...	44
4.1.2.1 Resultados do TT e do IGRA .....	44
4.1.2.2 Associação entre o TT e o IGRA.....	44
4.1.2.3 Avaliação dos resultados do TT e do IGRA de acordo com o diagnóstico de ILTB .....	46
4.1.2.4 Avaliação dos resultados do TT e do IGRA de acordo com o risco de infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Risco).....	47
4.1.2.4.1 TT e Risco.....	47
4.1.2.4.2 IGRA e Risco .....	48
4.1.2.4.3 Associação do TT e do IGRA de acordo com o Risco .....	50
4.1.2.4.4 Sensibilidade (Se), Especificidade (Es), Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN) do TT e do IGRA de acordo com o Risco nos pacientes infectados pelo HIV com ILTB.....	50
4.2 Análise dos resultados do grupo 2 composto por 90 pacientes infectados pelo HIV com tuberculose doença .....	52
4.2.1 Análise descritiva .....	52
4.2.1.1 Variáveis quantitativas .....	52
4.2.1.2 Variáveis qualitativas .....	53
4.2.2 Formas Clínicas da tuberculose .....	53
4.2.2.1 Sinais e sintomas compatíveis com a tuberculose .....	55
4.2.3 Método utilizado para o diagnóstico da tuberculose .....	55

4.2.3.1	Local de isolamento do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	56
4.2.4	Uso de terapia antirretroviral (TARV) .....	57
4.2.5	Teste tuberculínico (TT) e Ensaio de Liberação de Interferon Gama (IGRA) ....	57
4.2.5.1	Resultado do teste tuberculínico e do IGRA .....	57
4.2.5.2	Associação entre o TT e o IGRA .....	58
4.2.5.3	Concordância do TT e do IGRA .....	59
4.2.5.4	Pontos de corte dos valores de células T CD4+ visando à sensibilidade do TT e do IGRA .....	59
4.2.5.5	Relação entre a contagem de células T CD4+ e o resultado do TB Ag – Nil .....	61
4.3	Análise dos resultados do grupo 3 composto por 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco de infecção latente pelo <i>M. tuberculosis</i> (ILTB) .....	62
4.3.1	Análise descritiva .....	62
4.3.1.1	Variáveis quantitativas .....	62
4.3.1.2	Variáveis qualitativas .....	63
4.3.2	Teste tuberculínico (TT) e ensaio de liberação de Interferon gama (IGRA) .....	64
4.3.2.1	Resultados do TT e do IGRA .....	64
4.3.2.2	Associação entre o TT e o IGRA .....	64
4.3.2.3	Avaliação dos resultados do TT e do IGRA de acordo com o risco de infecção pelo <i>M. tuberculosis</i> (Risco) .....	66
4.3.2.3.1	TT e Risco .....	66
4.3.2.3.2	IGRA e Risco .....	67
4.3.2.3.3	Associação do TT e do IGRA de acordo com o Risco .....	68
4.3.2.3.4	Concordância do TT e do IGRA de acordo com o Risco .....	68
4.3.2.3.5	Sensibilidade (Se), Especificidade (Es), Valor Preditivo positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN) do TT e do IGRA de acordo com o Risco .....	69
4.4	Comparação dos resultados do grupo 1 (HIV/ILTB) e grupo 2 (HIV/TB-doença) .....	70
4.4.1	Análise descritiva .....	71
4.4.1.1	Variáveis quantitativas .....	71
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
5.1	Grupo 1 (Infectados pelo HIV com ILTB) .....	76
5.2	Grupo 2 (infectados pelo HIV com TB doença) .....	83
5.3	Grupo 3 (não infectados pelo HIV com ILTB) .....	90
5.4	Comparação do grupo 1 com o grupo 2 .....	93
5.5	Fluxograma proposto para investigação da infecção latente pelo <i>M. tuberculosis</i> (ILTB) .....	94
5.6	Fragilidades do estudo .....	96
5.7	Considerações finais .....	97

<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>98</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>100</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>130</b>
Abstract	
Apêndices	
Bibliografia Consultada	

## Lista de figuras

Figura 1. Patogênese da tuberculose e a participação do interferon gama. ....	15
Figura 2. Apresentação de antígenos do Mtb, liberação de citocinas e dosagem de Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) no sangue periférico.....	15
Figura 3. Diagrama de caixas (Boxplot) da contagem de linfócitos T CD4 + de acordo com o resultado do TT e do IGRa em 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	45
Figura 4. Apresentação da curva ROC para os resultados do IGRa (TB Ag-Nil) de acordo com o risco de infecção pelo <i>M. tuberculosis</i> nos pacientes do grupo 1 (infectados pelo HIV com risco de ILTB), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	49
Figura 5. Gráfico de setor circular para apresentação das frequências e respectivos percentuais das formas clínicas da tuberculose em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013.....	54
Figura 6. Gráfico de setor circular para apresentação das frequências e respectivos percentuais das formas extrapulmonares da TB em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença selecionados entre março/2012 e abril/2013.....	55
Figura 7. Ponto de corte para a variável CD4, visando maximizar (probabilidade de 93,75) a positividade dos exames PPD5 (esquerda), PPD10 (centro) e IGRa (direita) em 90 pacientes coinfectados HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo. A linha vertical aponta o valor do CD4 a partir do qual o rendimento diagnóstico dos exames é maximizado. ....	60
Figura 8. Ponto de corte para a variável CD4, visando obter uma sensibilidade próxima de 80% para os exames PPD5 (esquerda), PPD10 (centro) e IGRa (direita). A linha horizontal mostra a região de sensibilidade de 80%, e o ponto preto revela a sensibilidade próximo ao menor ponto de corte de CD4 em 90 pacientes coinfectados HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	61



Figura 9. Gráfico de dispersão entre a contagem de células T CD4+ (células/mm <sup>3</sup> ) e o resultado do TB Ag – Nil (UI/ml) em 90 pacientes coinfectados HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas três instituições do estudo (IIER, ISCMSP e ICF). .....	62
Figura 10. Diagrama de caixas (Boxplot) dos valores de células T CD4+ dos pacientes de acordo com os grupos: risco de ILTB com infecção pelo HIV (Grupo 1) e coinfecção HIV/TB (grupo 2). .....	72
Figura 11. Diagrama de caixas (Boxplot) dos valores de células T CD8+ dos pacientes de acordo com os grupos: risco de ILTB com infecção pelo HIV (grupo 1) e coinfecção HIV/TB (Grupo 2). .....	72
Figura 12. Diagrama de caixas (Boxplot) do log <sup>10</sup> da carga viral do HIV dos pacientes de acordo com os grupos: risco de ILTB com infecção pelo HIV (Grupo 1) e coinfecção HIV/TB (grupo 2). .....	73
Figura 13. Equilíbrio da resposta Th1 e Th2 .....	78
Figura 14. Fluxograma proposto para investigação da infecção latente pelo <i>M. tuberculosis</i> (ILTB). .....	95

## Lista de quadros

Quadro 1. Classificação do risco de infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	33
Quadro 2. Distribuição de 90 pacientes com HIV/risco de ILTB (grupo 1) e 90 coinfectados HIV/TB-doença (Grupo 2), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo, de acordo com a classificação do CDC/1992, adaptada pelo Ministério da Saúde em 2004 .....	74

## Lista de tabelas

Tabela 1.	Descrição das médias, desvios-padrão, valores mínimos e valores máximos relativos às variáveis quantitativas (idade, contagem de linfócitos T CD4+, contagem de linfócitos T CD8+, razão CD4/CD8, carga viral do HIV, $\log^{10}$ de carga viral do HIV, em 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	42
Tabela 2.	Descrição das frequências e respectivos percentuais relativos às variáveis qualitativas (instituição, sexo, cor da pele, vacinação com BCG, cicatriz vacinal, vacinação com vírus vivo e risco de infecção pelo <i>M. tuberculosis</i> ) em 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	43
Tabela 3.	Descrição das frequências e respectivos percentuais relativos ao resultado do TT e do IGRA em 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	44
Tabela 4.	Descrição das frequências relativas à associação do resultado do TT e do IGRA em 90 pacientes infectados pelo HIV sob risco de ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	45
Tabela 5.	Descrição das frequências relativas ao resultado do TT de acordo com o diagnóstico de ILTB em 90 pacientes infectados pelo HIV sob risco de ILTB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	46
Tabela 6.	Descrição das frequências relativas ao resultado do IGRA de acordo com o diagnóstico de ILTB em 90 pacientes infectados pelo HIV sob risco de ILTB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	47
Tabela 7.	Descrição das frequências relativas ao resultado do teste tuberculínico (positivo ou negativo), conforme o risco de infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> nos pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo .....	48

Tabela 8. Descrição das frequências relativas ao resultado do IGRA (positivo ou negativo), conforme o risco de infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> nos 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	48
Tabela 9. Descrição das frequências relativas ao resultado do TT e do IGRA nos pacientes infectados pelo HIV com baixo risco de infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (21 pacientes), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	50
Tabela 10. Descrição das frequências relativas ao resultado do TT e do IGRA nos pacientes infectados pelo HIV com alto risco de infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (69 pacientes), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	50
Tabela 11. Estimativas e intervalos de confiança, nível de 95%, para as medias de sensibilidade (Se), especificidade (Es), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do TT e IGRA, utilizando o risco como padrão-ouro nos 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	51
Tabela 12. Descrição das frequências e respectivos percentuais relativos ao tratamento para ILTB atual e fármaco utilizado em 90 pacientes infectados pelo HIV com ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas três instituições do estudo.....	52
Tabela 13. Descrição dos valores médios, mínimos, máximos e desvios-padrão da idade, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, relação CD4/CD8, carga viral do HIV, $\log^{10}$ (CV) do HIV, em 90 pacientes coinfectados pelo HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013.....	52
Tabela 14. Distribuição das frequências e dos respectivos percentuais das instituições que os pacientes pertenciam (Instituto Clemente Ferreira, ICF; Instituto de Infectologia Emílio Ribas, IIER; Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, ISCMSP); sexo; cor da pele; vacinação com BCG; cicatriz vacinal do BCG; vacinação com vírus vivo em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013 .....	53

Tabela 15. Distribuição das frequências e dos respectivos percentuais das formas clínicas da tuberculose em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013.....	54
Tabela 16. Distribuição das frequências e respectivos percentuais das formas da TB extrapulmonar, em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013.....	54
Tabela 17. Distribuição das frequências e respectivos percentuais relativos aos sinais e sintomas clínicos compatíveis com tuberculose doença em 90 pacientes infectados pelo HIV selecionados entre março/2012 e abril/2013 .....	55
Tabela 18. Distribuição das frequências e respectivos percentuais do método utilizado para a confirmação do diagnóstico da TB: baciloscopia (BAAR); cultura; exame anatomopatológico; baciloscopia e cultura; cultura e anatomopatológico; baciloscopia, cultura e anatomopatológico, em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013.....	56
Tabela 19. Distribuição das frequências e dos percentuais referentes ao local de isolamento do agente etiológico em 90 pacientes infectados pelo HIV com tuberculose doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013.....	56
Tabela 20. Distribuição das frequências e dos percentuais referentes ao resultado do teste tuberculínico (com ponto de corte de 5 mm e de 10 mm) e resultado do IGRA em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013.....	57
Tabela 21. Distribuição das frequências e dos respectivos percentuais relativos ao resultado do teste tuberculínico (com ponto de corte acima de 5 mm e acima de 10 mm) e resultado do IGRA de acordo com a contagem de células T CD4+ ( $\geq 200$ ou $< 200$ células/mm <sup>3</sup> ) em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013 .....	58
Tabela 22. Descrição das frequências relativas à associação do resultado do TT e do IGRA em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença (grupo 2), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	58

Tabela 23. Sensibilidade do teste tuberculínico (PPD5 e PPD10) e do IGRA em 90 pacientes coinfectados HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	60
Tabela 24. Sensibilidade do teste tuberculínico (PPD5 e PPD10) e do IGRA, de acordo com o ponto de corte na variável CD4 em 90 pacientes coinfectados HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo .....	60
Tabela 25. Sensibilidade do teste tuberculínico (PPD5 e PPD10) e do IGRA, de acordo com o ponto de corte na variável CD4 em 90 pacientes coinfectados HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo .....	61
Tabela 26. Descrição da média e desvio padrão relativos às variáveis quantitativas (idade tamanho da enduração do teste tuberculínico) em 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco de ILTB (grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo .....	63
Tabela 27. Descrição das frequências e percentuais relativos à instituição a que os pacientes pertencem (ICF, IIER, ISCMSP), sexo, cor da pele, vacinação com BCG, cicatriz vacinal, vacinação com vírus vivo e risco de infecção pelo <i>M. tuberculosis</i> em 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco de ILTB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 .....	63
Tabela 28. Descrição das frequência e percentuais relativos ao resultado do teste tuberculínico (TT) e do IGRA em 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco de ILTB (grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	64
Tabela 29. Descrição das frequências relativas à associação do resultado do TT e do IGRA nos 90 sem infecção pelo HIV com risco de ILTB (grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	64
Tabela 30. Descrição das frequências relativas ao resultado do TT de acordo com o diagnóstico de ILTB em 90 pacientes não infectados pelo HIV sob risco de ILTB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo .....	65

Tabela 31. Descrição das frequências relativas ao resultado do IGRA de acordo com o diagnóstico de ILTB em 90 pacientes não infectados pelo HIV sob risco de ILTB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo .....	66
Tabela 32. Descrição das frequências relativas ao resultado do teste tuberculínico (positivo ou negativo), conforme o risco de infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> nos pacientes sem infecção pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo .....	67
Tabela 33. Descrição das frequências relativas ao resultado do IGRA (positivo ou negativo), conforme o risco de infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (alto ou baixo) em 90 pacientes sem infecção pelo HIV com ILTB (Grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	67
Tabela 34. Descrição das frequências relativas aos resultados do teste tuberculínico (TT) e do IGRA nos 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco baixo de ILTB (Grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	68
Tabela 35. Descrição das frequências relativas aos resultados do teste tuberculínico (TT) e do IGRA nos 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco alto de ILTB (Grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	68
Tabela 36. Estimativas e intervalos de confiança, nível de 95%, para as medias de sensibilidade (Se), especificidade (Es), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do TT e IGRA, utilizando o risco como padrão-ouro nos 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	70
Tabela 37. Descrição das frequências e respectivos percentuais relativos ao tratamento da ILTB atual e fármaco utilizado em 90 pacientes não infectados pelo HIV com risco de ILTB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.....	70

Tabela 38. Descrição das médias, desvio-padrões, valores mínimos e máximos da contagem de células T CD4+ (células/mm <sup>3</sup> ), contagem de células T CD8+(células/mm <sup>3</sup> ), carga viral do HIV(cópias/ml) e log de carga viral do HIV em 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB e 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas três instituições do estudo.....	71
--	----



## Lista de abreviaturas

<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>ATS</b>	American Thoracic Society
<b>BAAR</b>	Bacilo álcool-ácido resistente
<b>BACTEC</b>	<i>Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD</i>
<b>BCG</b>	Bacilo de Calmette e Guérin
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>
<b>CD3</b>	<i>cluster of differentiation-3</i>
<b>CD4</b>	<i>cluster of differentiation-4</i>
<b>CD8</b>	<i>cluster of differentiation-8</i>
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>HIV/TB</b>	Co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana/tuberculose
<b>CRT-DST/AIDS</b>	Centro de Referência e Treinamento-Doenças Sexualmente Transmissíveis/ Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>DOTS</b>	<i>Directly observed treatment strategy</i>
<b>DST</b>	Doenças sexualmente transmissíveis
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FDA</b>	<i>Federal Drugs Administration</i>
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>HPA</b>	<i>Health Protection Agency</i>
<b>IDSA</b>	Infectious Diseases Society of America
<b>IFN-alfa (INF-<math>\alpha</math>)</b>	Interferon-alfa
<b>IFN-gama (INF-<math>\gamma</math>)</b>	Interferon-gama
<b>IGRA</b>	<i>Interferon Gamma Release Assay</i>
<b>ILTB</b>	Infecção Latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

<b>IL – 1</b>	Interleucina – 1
<b>IL – 2</b>	Interleucina – 2
<b>IL – 4</b>	Interleucina – 4
<b>IL – 5</b>	Interleucina - 5
<b>IL – 6</b>	Interleucina-10
<b>IL-12</b>	Interleucina-12
<b>IL-18</b>	Interleucina-18
<b>INH (H)</b>	Isoniazida
<b>IUAT</b>	International Union Against Tuberculosis
<b>LBA</b>	Lavado broncoalveolar
<b>Mtb</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>NICE</b>	National Institute for Health and Clinical Excellence
<b>NK</b>	Células <i>natural killer</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PPD</b>	<i>purified protein derivative</i>
<b>PPD-Rt 23</b>	<i>purified protein derivative rhesus twin 23° experiment</i>
<b>PPD-Standard</b>	<i>purified protein derivative standart</i>
<b>TARV</b>	Terapia antirretroviral
<b>TBMR</b>	Tuberculose multirresistente
<b>Th1</b>	Resposta imune do tipo 1
<b>Th2</b>	Resposta imune do tipo 2
<b>TLRs</b>	tll-like receptors
<b>TNF-alfa (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>Western Blot</b>	Ensaio de imunoeletrotransferência
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

## Resumo

A tuberculose (TB) é um grave problema de saúde pública no Brasil e a principal causa de morte em pacientes com AIDS. Até 2001, o Teste Tuberculínico (TT) era a única ferramenta disponível para avaliação de indivíduos com suspeita de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ILTB); nos últimos anos, ganhou espaço o IGRA (*Interferon Gamma Release Assay*) que detecta o IFN-gama secretado por células T circulantes, quando estimuladas *ex vivo* por antígenos específicos do *M. tuberculosis* (Mtb). O papel do IGRA para o diagnóstico da ILTB e da TB doença em pacientes infectados pelo HIV ainda não está bem estabelecido. Este estudo transversal comparou o TT com o IGRA (QuantiFERON®-TB Gold In Tube, Cellestis, Carnegie, Austrália) para o diagnóstico da ILTB e da TB doença. Um total de 270 indivíduos foram divididos em três grupos: grupo 1, 90 pacientes infectados pelo HIV e com risco de ILTB; grupo 2, 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença e grupo 3, 90 indivíduos não infectados pelo HIV, com risco de ILTB. No grupo 1, o IGRA apresentou melhor desempenho, e melhor concordância com o diagnóstico de ILTB que o TT (Kappa: 0,769 e 0,384, respectivamente) e demonstrou, ainda, boa concordância com o risco de infecção pelo Mtb (Kappa: 0,724). No grupo 3, o TT e o IGRA apresentaram boa sensibilidade (92,11% e 97,37%, respectivamente); o TT apresentou melhor concordância com o diagnóstico de ILTB do que o IGRA (Kappa: 0,580 e 0,214, respectivamente); contudo, o valor preditivo negativo (VPN) do IGRA de acordo com o risco foi mais alto do que o do TT (95,24% e 57,14%, respectivamente). No grupo 2, a sensibilidade dos dois testes foi baixa (TT: 25,56% e IGRA: 65,56%); porém, o IGRA mostrou melhor desempenho que o TT em pacientes mais imunossuprimidos, avaliados pela contagem de TCD4 (ponto de corte do IGRA: 187 células/mm<sup>3</sup> e do TT: 473 células/mm<sup>3</sup>). Concluímos que para detecção de ILTB, o IGRA demonstrou melhor desempenho que o TT nos infectados e nos não infectados pelo HIV e demonstrou, ainda, melhor associação com o risco de infecção pelo *M. tuberculosis*. Todavia, nos não infectados o TT demonstrou melhor associação com o diagnóstico de ILTB, enquanto que o VPN do IGRA foi superior. Nos indivíduos coinfectados (HIV/TB-doença), o IGRA mostrou melhor desempenho que o TT e foi capaz de detectar a doença em pacientes mais imunossuprimidos; todavia, os dois testes apresentaram baixa sensibilidade e não foram apropriados para o diagnóstico da doença. O presente estudo indica que o

IGRA é um bom método para o diagnóstico da ILTB mas não para o diagnóstico da TB doença.

## 1. INTRODUÇÃO

---

No Brasil, a tuberculose (TB) é um grave problema de saúde pública, sendo a principal causa de morte em pacientes com AIDS (Girardi et al., 2000) e uma das infecções oportunistas mais frequentes (Reid et al., 2006).

Apesar da redução da incidência da tuberculose no mundo, as estimativas ainda são preocupantes. Em 2012 foi de 8,6 milhões, 13% em infectados pelo HIV; com 1,3 milhões de mortes, 320.000 casos em coinfectados (HIV/TB) (World Health Organization, 2013; Zumla et al., 2013).

Em imunocompetentes, o risco de desenvolver TB no decorrer da vida, é de 5 a 15% (World Health Organization, 2009); já em infectados pelo HIV é de 5 a 15% ao ano (Guelar et al., 1993; Antonucci et al., 1995), ou 50% no decorrer da vida (Noertjojo et al., 2002; Corbett et al., 2003; Moran-Mendoza et al., 2007; World Health Organization, 2009; Abubakar et al., 2011; Andrews et al., 2012; Hill et al., 2012; McNerney et al., 2012; Zignol et al., 2012). No entanto, problemas antigos como a falta de sinais e sintomas clássicos da TB e a variedade dos aspectos radiológicos da doença em pacientes com AIDS, além das limitações dos testes para o diagnóstico da TB e da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ILTB), representam grande obstáculo para a agilidade do diagnóstico e do tratamento (Jones et al., 1993; Klautau, Kuschnaroff, 2005).

Em pacientes infectados pelo HIV, o tratamento da ILTB é a principal forma de prevenir a ocorrência da doença, com redução da incidência em 70 a 90% (Golub et al., 2007; Kaplan et al., 2009; Chee et al., 2013). Estudo nacional demonstrou aumento da sobrevivência, nos indivíduos infectados pelo HIV com teste tuberculínico positivo que receberam tratamento da ILTB (de Pinho et al., 2001). Esse fato deve-se ao grande risco de pacientes infectados pelo HIV de desenvolver TB primária (em torno de 45%), tuberculose de reativação, recidiva e recorrência da TB (Santoro-Lopes et al., 2002; Lawn et al., 2005a).

Apesar da importância da terapia antirretroviral (TARV) na redução da incidência da TB e da mortalidade nos coinfectados (HIV/TB), especialmente nos indivíduos com imunossupressão grave (Blanc et al., 2011), a incidência da doença permanece inaceitavelmente alta, e muitos pacientes apresentam TB antes da indicação do uso de TARV (Santoro-Lopes et al., 2002; Horsburgh, 2004; Lawn et al., 2005a).

## 1.1 Infecção Latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ILTB)

A ILTB se refere à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) sem o desenvolvimento da doença ativa (tuberculose doença). Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo Mtb (Smith et al., 2003; Zumla et al., 2013).

A detecção da ILTB e o tratamento medicamentoso para os indivíduos infectados que apresentam maior risco de progressão para doença ativa são as únicas formas atuais de prevenção eficaz contra o adoecimento por tuberculose, sendo uma das estratégias de controle da TB conhecida e recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Conde et al., 2009; World Health Organization, 2009; Ministério da Saúde, 2011; World Health Organization, 2013). O programa *Stop TB partnership* da Organização Mundial de Saúde, considera estratégia fundamental, uma vez que a implantação dos DOTS (*directly observed treatment strategy*) para a TB doença, apesar de muito importante, não foi suficiente para o controle da doença mesmo nos países em que foi implantada com sucesso e em ampla escala (World Health Organization, 2009, 2013). Assim, a associação das estratégias é fundamental.

### 1.1.1 Desafios no diagnóstico da ILTB

A dificuldade de firmar o diagnóstico da ILTB é um problema mundial, pois, não existe um padrão-ouro. No Brasil, o diagnóstico da ILTB é feito através da presença de um teste tuberculínico (TT) positivo, associado à exclusão da TB doença (Conde et al., 2009; Ministério da Saúde, 2011). Outro desafio para o diagnóstico da ILTB é a interpretação dos resultados do TT em pacientes imunodeprimidos, especialmente naqueles com infecção pelo HIV/AIDS com diferentes estadios de imunodepressão. Desta forma, novos testes diagnósticos são necessários para detecção da ILTB, especialmente nesta população. Os testes laboratoriais que utilizam a dosagem de interferon gama por linfócitos ativados estimulados por antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* foram desenvolvidos com o objetivo de auxiliar ou substituir o TT no diagnóstico da ILTB (Mazurek et al., 2010; National Institute for Health and Clinical Excellence, 2011).

Esses testes baseiam-se na observação de que a infecção pela micobactéria induz a uma forte resposta imune celular do tipo T-helper-1 (Mazurek et al., 2010; World Health Organization, 2011a, 2011b, 2011c). O *Mycobacterium tuberculosis*, patógeno intracelular é frequentemente encontrado em fagossomas dos macrófagos. Na forma latente da doença há pouca exposição dos antígenos da micobactéria, com baixa probabilidade de serem reconhecidos pelos linfócitos B e, conseqüentemente, a estimulação da resposta humoral com produção de anticorpos, não será eficaz. Todavia, os antígenos bacterianos processados pelos macrófagos infectados são apresentados a linfócitos T antígeno-específicos, que desencadeiam uma série de respostas imunes, com aparecimento de linfócitos T sensibilizados e com capacidade de responder ao antígeno da micobactéria com liberação de interferon gama, que pode ser utilizado como marcador de infecção (Mazurek et al., 2010; World Health Organization, 2011a, 2011b, 2011c).

## 1.2 Risco de adoecimento por tuberculose

O reconhecimento dos indivíduos que têm maior risco de desenvolver TB doença é a chave para indicar corretamente o tratamento da ILTB, assim, o CDC, *Central for Diseases Control* - EUA (Centers for Disease Control and Prevention, 2013) considera dois grandes grupos de risco para desenvolver a doença. Os indivíduos que têm maior probabilidade de exposição à pessoas bacilíferas (contatos próximos, imigrantes de zona endêmica de TB, indivíduos que trabalham ou residem em instituições com pessoas com alto risco para TB como abrigos, penitenciárias, asilos, instituições que abrigam infectados pelo HIV, hospitais que tratam de pacientes com TB); e os indivíduos com condições clínicas ou outros fatores associados ao aumento do risco de progressão da ILTB para TB doença como a AIDS (Kaplan et al., 2009), usuários de droga, evidência radiológica de TB no passado (International Union Against Tuberculosis Committee on Prophylaxis, 1982; Linh et al., 2007), baixo peso corporal (10% abaixo do peso ideal) (Pakasi et al., 2009), silicose (Chang et al., 2001), *Diabetes mellitus* (Jeon, Murray, 2008), insuficiência renal crônica dialítica (Chia et al., 1998), gastrectomia e derivação jejunoileal (Bruce, Wise, 1977; Yokoyama et al., 2004), transplante de órgãos sólidos (Chou et al., 2004), neoplasia maligna de cabeça e pescoço, uso prolongado de



corticosteroides ou outros imunossupressores como os anti TNF-alfa, conversores recentes do TT (aumento de 10 mm ou mais do tamanho da enduração num período de até dois anos), bebês e crianças com TT positivo (Kaplan et al., 2009).

Cerca de 10% dos adultos imunocompetentes infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* não tratados adoecerão, e o risco aumentado de desenvolver TB doença acontece, especialmente, nos dois primeiros anos após a infecção. Aproximadamente 90% dos casos de TB secundária entre contatos ocorrem neste período (Moran-Mendoza et al., 2007). No município do Rio de Janeiro enquanto a incidência de TB na comunidade geral foi de 94 casos/100.000 habitantes em 2007, uma incidência de 1.649 casos /100.000 habitantes foi demonstrada entre contatos acompanhados durante dois anos em um serviço de saúde (Cailleaux-Cezar et al., 2009). Além disso, aproximadamente 2% dos contatos apresentam o diagnóstico de TB doença no momento da avaliação inicial (Marks et al., 2000; Noertjojo et al., 2002; Aissa et al., 2008), o que torna de grande importância a avaliação criteriosa dos contatos.

Alguns fatores independentes associados ao maior risco de desenvolvimento de TB em contatos incluem: extremos de idade (idade  $\leq 10$  anos ou  $> 60$  anos); presença de imunossupressão; exposição intradomiciliar e, entre estes, aqueles que dividem o mesmo dormitório apresentam maior risco de ILTB (Gerald et al., 2002; Rathi et al., 2002; Gustafson et al., 2007; Aissa et al., 2008); exposição a caso de TB pulmonar ou de vias aéreas, como a TB laríngea com baciloscopia e/ou cultura positiva (Noertjojo et al., 2002; Gustafson et al., 2007; Moran-Mendoza et al., 2007); quanto maior a quantidade de bacilos encontrados em amostra de escarro de casos de TB pulmonar, maior a chance de ILTB entre os contatos (Rathi et al., 2002; Aissa et al., 2008); presença de cavitação na radiografia de tórax do caso índice (Marks et al., 2000; Gerald et al., 2002); maior tempo de exposição ao caso de TB pulmonar e exposição em locais com pouca ventilação (Gerald et al., 2002; Gustafson et al., 2004; Golub et al., 2006).

Aproximadamente 20 a 50% do total de contatos apresentam ILTB, demonstrada através de TT positivo (Gerald et al., 2002; Aissa et al., 2008). Em estudo realizado no Brasil, a única variável capaz de predizer o desenvolvimento de TB doença entre contatos adultos não infectados pelo HIV foi a presença de um TT  $\geq$

5mm (Cailleaux-Cezar et al., 2009). Além disso, já foi demonstrado que até 17% dos casos de TB entre contatos podem ser atribuídos à transmissão por focos com baciloscopia direta negativa (Behr et al., 1999), sendo portanto, fundamental a estratificação do risco de infecção pelo *M. tuberculosis* entre os contatos.

A corticoterapia oral pode estar associada à reativação da TB, especialmente, naqueles que recebem altas doses e por tempo prolongado (Kim et al., 1998; Brassard et al., 2009). A dose e o tempo de tratamento utilizados para definir maior risco de adoecimento por TB não são conhecidos, entretanto, foi demonstrado que o uso de 15 mg/dia de prednisona durante 2 a 4 semanas pode suprimir a resposta ao TT (Schatz et al., 1976). O uso prolongado de corticoide inalatório não parece estar associado ao desenvolvimento de TB doença (Bahceciler et al., 2000; Bahceciler, 2012), porém novos estudos sugerem que o uso de corticoide inalatório em altas doses e por período prolongado pode associar-se ao desenvolvimento de TB (Lee et al., 2013).

Os pacientes em uso de bloqueadores de TNF- $\alpha$  apresentam risco aumentado de progressão para TB doença (Gomez-Reino et al., 2007; Tubach et al., 2009). Estudos descritivos demonstram uma mediana de 12 semanas de tratamento com bloqueadores de TNF- $\alpha$  até que o episódio de TB ocorra, sendo a maioria dos casos de TB extrapulmonar (Keane et al., 2001; Gomez-Reino et al., 2003). Em estudo realizado na Espanha com pacientes em tratamento com bloqueadores de TNF- $\alpha$ , a probabilidade de desenvolvimento de TB doença foi sete vezes maior em pacientes com TT  $\geq$  5mm e/ou radiografia de tórax sugestiva de TB prévia que não receberam tratamento para ILTB, do que naqueles que receberam tratamento (Gomez-Reino et al., 2007). O tratamento com inibidores de TNF-  $\alpha$  aumenta o risco de adoecimento por TB. Portanto, triagem para investigar ILTB e avaliar a indicação de tratamento, antes da terapia com inibidores de TNF- $\alpha$  é recomendada, mesmo em áreas de baixa endemicidade da doença (Kwakernaak et al., 2011).

O maior risco, entretanto, é causado pela coinfecção pelo HIV. Em estudo realizado no Brasil, a incidência de TB entre indivíduos com HIV/AIDS durante 60 meses de seguimento foi de 1,24/100 pessoas-ano, sendo maior em pacientes com contagem basal de linfócitos T CD4+  $\leq$  200 células/mm<sup>3</sup> que não se encontravam em uso de terapia antirretroviral (Lannoy et al., 2008).

Além da reativação da ILTB, os infectados pelo HIV apresentam risco aumentado de TB doença após infecção recente, independentemente do resultado do TT. Estudo de genotipagem das cepas de *M. tuberculosis* de amostras clínicas de contatos de TB pulmonar realizado em *San Francisco* nos EUA, observou aumento do risco de TB após a infecção recente (Cattamanchi et al., 2006). Entre usuários de drogas injetáveis com ILTB, o risco de progressão para doença ativa também é maior para aqueles com coinfeção pelo HIV (Selwyn et al., 1989), chegando a uma incidência de 7,9/100 pessoas-ano em estudo realizado em *New York*, EUA (Tegbaru et al., 2006). Na medida em que a terapia antirretroviral tornou a sobrevida dos pacientes com infecção pelo HIV longa, se não tratados, certamente desenvolverão TB doença durante a vida.

O tratamento da ILTB reduz em 60 a 90% o risco de adoecimento (International Union Against Tuberculosis Committee on Prophylaxis, 1982). Quanto mais longo e melhor a adesão ao tratamento, maior a sua efetividade (Comstock et al., 1967; Comstock, 1999). Entretanto, alguns esquemas podem causar toxicidade hepática (Gao et al., 2006). Desta forma, identificar os pacientes infectados, e principalmente, detectar aqueles com maior risco de adoecimento, que mais se beneficiariam do tratamento, é fundamental, assim o adequado controle da TB só poderá ser alcançado com uma vacina eficaz e com o tratamento dos casos de ILTB com alto risco de adoecimento (Zumla et al., 2013).

Outros grupos de indivíduos com elevado risco de ILTB incluem profissionais de saúde (Joshi et al., 2006), usuários de drogas injetáveis, população indígena, prisioneiros e moradores de abrigos ou asilos. Em estudo realizado em quatro hospitais de diferentes regiões do Brasil, a taxa de ILTB entre profissionais de saúde foi cerca de 60%, o cargo profissional de enfermeiro e a história de exposição à TB em ambiente hospitalar foram os principais fatores de risco para adquirir ILTB (Roth et al., 2005). A prevalência de ILTB entre prisioneiros no Brasil, também é elevada, atingindo aproximadamente 60% destes indivíduos (Lemos et al., 2009). Entre moradores de abrigos e asilos, esta taxa corresponde a cerca de 40% e apresenta-se em 20% entre usuários de drogas injetáveis, com maior chance de infecção para aqueles com mais de 10 anos de uso (Schluger et al., 1997; Salomon et al., 2000; Brassard et al., 2004).

Nos últimos 500 anos, a tuberculose tem sido preocupação na população indígena brasileira, epidemia caracterizada por falha no tratamento frequente e altas taxas de mortalidade (Amarante et al., 1999; Escobar et al., 2001; Amarante et al., 2003; Garnelo et al., 2003; Marques, da Cunha, 2003; Basta et al., 2004, 2006; Levino, de Oliveira, 2007). Determinantes sociais e ambientais, tais como o analfabetismo, baixa renda, alto índice de desnutrição, parasitoses intestinais, alcoolismo, residências pouco ventiladas e iluminadas, e uma alta densidade de pessoas em cada família estão intimamente associados com a alta transmissibilidade e incidência de TB nas comunidades indígenas e merecem atenção especial (Buchillet, Gazin, 1998; Amarante et al., 2003; Moran-Mendoza et al., 2007; Marques et al., 2010; Croda et al., 2012; Sacchi et al., 2013; Yuhara et al., 2013).

### 1.3 Diagnóstico da ILTB

#### 1.3.1 Teste Tuberculínico (TT)

A primeira reação tuberculínica foi observada por Robert Koch ao usar filtrado de culturas de bacilos submetidos à cocção, que chamou de *old tuberculin* (tuberculina envelhecida), em cobaias previamente infectadas. Em 1932, Florence Seibert, isolou uma proteína de baixo peso molecular de um filtrado de culturas do *Mycobacterium tuberculosis* por meio da precipitação com ácido tricloroacético, conhecida como PPD-*Standart* (Derivado Proteico Purificado Padrão).

Assim, o teste tuberculínico utilizado para o diagnóstico ILTB há quase um século, baseia-se na resposta celular de hipersensibilidade do tipo tardia, realizado através do método Mantoux (Mantoux, 1912), o qual consiste na aplicação por via intradérmica da tuberculina, PPD-Rt 23 (Derivado Proteico Purificado, R do macaco *rhesus*, T de *twin* um conservante e 23 do resultado do 23º experimento), no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, na dose de 0,1ml, equivalente a duas UT (unidades de tuberculina). O resultado do TT é registrado 72 a 96 horas após a aplicação, correspondendo a medida em milímetros do maior diâmetro transversal da

área de endureção (nódulo) local palpável (Daniel, 1980; Hernández-Pando et al., 2007; Barreto et al., 2008; Conde et al., 2009; Ministério da Saúde, 2011).

Em estudos populacionais e alguns casos clínicos específicos, observou-se que testes repetidos podem expressar um aumento do tamanho da endureção conhecido como fenômeno booster ou reação anamnésica (ana = não + amnésia = esquecimento), que se caracteriza pelo retorno da memória imunológica adormecida estimulada pelo TT inicial, não sendo, portanto, um procedimento rotineiro (Daniel, 1980; Caminero Luna, 2003).

Vantagens importantes do TT incluem a facilidade técnica do método e o seu baixo custo, entretanto, a sua especificidade pode ser afetada pela vacinação prévia com BCG e por infecção por micobactérias não tuberculosas, com possibilidade de resultados falso-positivos nestas situações (Wang et al., 2002). Resultados falso-negativos podem ser observados em indivíduos anérgicos ou imunossuprimidos, com sensibilidade reduzida do TT em situações como gravidez, desnutrição, sarcoidose, neoplasias malignas, indivíduos nos extremos de idade, crianças com menos de dois meses e adultos com mais de 65 anos, além da imunossupressão relacionada à infecção pelo HIV; neste caso, a possibilidade de falso-negativo aumenta conforme a progressão da infecção pelo HIV (Ministério da Saúde, 2008a, 2008b; Conde et al., 2009; Ministério da Saúde, 2011, 2013). Vacinados com BCG há menos de dois a três anos devem ter interpretação especial do TT. A vacinação com vírus vivo, particularmente o vírus do sarampo, também pode interferir no resultado TT, com possibilidade de falso negativo (Advisory Committee on Immunization Practices, 2011). O grande desafio na interpretação do TT é identificar o ponto de corte do resultado e em qual população está indicado o tratamento da ILTB, já que nem todos os indivíduos com ILTB desenvolverão TB doença em algum momento da vida. Outro problema é a necessidade de duas visitas: uma primeira para a injeção intradérmica da tuberculina e uma segunda para a leitura do diâmetro endurecido, realizado por profissional treinado. Uma vez que a vacinação com o BCG faz parte do programa básico de imunização no Brasil, a utilização do TT na decisão diagnóstica possui limitações, em particular em crianças de baixa idade (Sant'anna et al., 2002; Bierrenbach et al., 2003). Em regiões de alta incidência de TB, a frequência de positividade do TT na população geral oscila entre 25% e 55%

(American Thoracic Society, 2000; Castelo Filho et al., 2004). Apesar do grande risco de adoecimento, a população infectada pelo HIV necessita de meios mais sensíveis e específicos para o diagnóstico da ILTB. O programa de tratamento da AIDS, no Brasil, serve como modelo internacional e o tratamento profilático da TB com isoniazida (INH) é uma das recomendações do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2008a, 2008b; Conde et al., 2009; Ministério da Saúde, 2011, 2013), todavia, a profilaxia para TB é pouco utilizada no país (Pacheco et al., 2008).

Para este fim, testes mais sensíveis e específicos do que o TT em pacientes com imunodepressão, devem ser almejados. O papel dos IGRAs (*interferon gamma release assay*) nos pacientes com coinfeção pelo HIV ainda não foi estabelecido. Entre as linhas prioritárias de pesquisa recomendadas pelas diretrizes nacionais para o controle e erradicação da TB, está o desenvolvimento, validação e análise da acurácia de novos testes laboratoriais (Conde et al., 2009; Ministério da Saúde, 2011).

#### **1.3.1.1 Interpretação do teste tuberculínico, detecção de ILTB e indicações de tratamento**

O resultado do TT orienta a necessidade de tratamento da ILTB nos diferentes contextos epidemiológicos. Assim, o TT deve ser realizado para o diagnóstico de ILTB em grupos de indivíduos com risco aumentado de desenvolver TB doença, para os quais o tratamento da ILTB esteja indicado.

A repetição do TT é recomendada para os indivíduos com maior possibilidade de infecção recente pelo *M. tuberculosis* que apresentem um TT negativo. Assim, contatos de casos de TB pulmonar com resultado do TT inicial menor do que 5 mm devem ser submetidos a novo TT de 8 a 12 semanas após o primeiro teste pela possibilidade de viragem tuberculínica em caso de infecção recente pelo Mtb (Moran-Mendoza et al., 2007). Em grupos de indivíduos expostos regularmente a locais com alta probabilidade de transmissão do *M. tuberculosis* como profissionais de saúde, prisioneiros e moradores de abrigos ou asilos, a realização periódica do TT naqueles com teste inicial negativo para acessar infecção recente também é considerada como medida de controle da TB (MacIntyre, Plant, 1998; Jasmer et al.,

1999; Joshi et al., 2006). Não foram encontrados estudos avaliando qual a periodicidade ideal para a repetição do TT em indivíduos com TT inicial negativo, entretanto, programas de triagem de ILTB com TT voltados para grupos de risco consideram a conversão do TT em um período de dois anos como presuntiva de infecção recente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (American Thoracic Society, 2000).

A repetição periódica do teste após um TT inicial negativo também é recomendada por Programas de Controle da TB em alguns grupos de indivíduos com ILTB e risco especialmente elevado de desenvolvimento de TB doença. Tais grupos incluem indivíduos com infecção pelo HIV, que devem ter o TT repetido após reconstituição imunológica decorrente da terapia antirretroviral, usuários de drogas injetáveis e aqueles em uso prolongado de drogas imunossupressoras como bloqueadores de TNF- $\alpha$  e corticoide oral (Joshi et al., 2006; Gomez-Reino et al., 2007).

Um TT  $\geq 5$  mm sugere ILTB com necessidade de tratamento nos seguintes grupos de indivíduos: contatos recentes de casos de TB pulmonar, infectados pelo HIV, aqueles com lesões fibróticas na radiografia torácica sugerindo episódio prévio de TB pulmonar não tratada, candidatos a transplantes ou imunossuprimidos por outras razões como uso de bloqueadores de TNF- $\alpha$  e corticoide oral. Estudos avaliando o impacto do tratamento da ILTB com isoniazida durante pelo menos seis meses, demonstraram uma redução no risco de desenvolvimento de TB doença de 76% em dois anos em indivíduos infectados pelo HIV recebendo INH em associação com antirretrovirais (Golub et al., 2007) e 69% em cinco anos naqueles com lesões fibróticas na radiografia torácica (International Union Against Tuberculosis Committee on Prophylaxis, 1982).

Os grupos de indivíduos considerados para tratamento da ILTB devido a um TT  $\geq 10$ mm incluem usuários de drogas injetáveis, aqueles com condições clínicas como silicose, diabetes mellitus, doença renal crônica em diálise, neoplasia maligna, e candidatos a procedimentos como gastrectomia e *by-pass* gastrointestinal (Feld et al., 1976; Bruce, Wise, 1977; Chia et al., 1998; Chang et al., 2001). O tratamento da ILTB em pacientes com silicose apresentando TT  $\geq 10$ mm levou a uma redução de 50% nos casos de TB doença (British Medical Research Council, 1992).

O Ministério da Saúde recomenda terapia profilática com INH nas seguintes situações em pacientes com infecção pelo HIV: contatos próximos (domiciliar ou institucional) de pacientes com TB (independentemente do TT), sequelas de TB na radiografia de tórax quando a TB não foi tratada,  $TT \geq 5$  mm e  $TT < 5$  mm quando foi constatado TT anterior positivo sem tratamento da ILTB na ocasião (Ministério da Saúde, 2008a, 2008b; Conde et al., 2009; Ministério da Saúde, 2011, 2013). Em estudo realizado no Brasil, Golub et al. (2007) demonstraram que a terapia antirretroviral (TARV) isolada reduz em 59% o risco de desenvolver TB e a adição de terapia profilática com INH acrescenta uma redução de 24% (de Pinho et al., 2001). Esta redução na incidência de TB com a combinação TARV e INH foi observada tanto para pacientes com imunodepressão inicial como avançada.

O tratamento padrão para a ILTB é feito com isoniazida diariamente durante seis a nove meses. Outras opções incluem a terapia com rifampicina por quatro meses; isoniazida e rifampicina por três meses; rifampicina e pirazinamida por dois meses ou isoniazida e rifapentina por três meses. A identificação dos indivíduos com ILTB e seu tratamento, reduz a incidência da TB em países desenvolvidos e abordagens similares são uma grande promessa para outros países (Ahmad, 2010).

#### **1.3.1.2 BCG e teste tuberculínico**

A vacinação com BCG na infância pode fornecer um efeito protetor contra o desenvolvimento de TB doença, especialmente nas formas meníngea e disseminada (Colditz et al., 1994). Entretanto, a BCG tem sido descrita como um potencial fator confundidor para a utilização do TT na investigação de ILTB pela possibilidade de produzir resultados falso-positivos do teste. Duas revisões sistemáticas de estudos avaliando o efeito da vacinação BCG nos resultados do TT demonstraram que indivíduos vacinados previamente apresentam resultados maiores do TT quando comparados a indivíduos não vacinados, porém, este efeito torna-se reduzido quanto maior o tempo entre a vacinação e a aplicação do TT (Wang et al., 2002; Farhat et al., 2006). Em estudo que avaliou a interferência da vacinação com BCG e o resultado do TT, Wang et al. (2002), demonstraram uma redução do risco relativo de obter um TT positivo de 3,56 para 1,46 quando o tempo entre a vacinação com



BCG e o TT foi menor ou igual a 15 anos e maior que 15 anos, respectivamente. Além disso, neste estudo, um TT  $\geq 15$  mm foi associado principalmente à ILTB do que à vacinação prévia com BCG. Assim, com base nesses resultados, a interpretação do TT deve considerar o contexto clínico-epidemiológico, além de outros fatores de risco para ILTB, especialmente quando o teste é realizado em um período próximo à vacinação com BCG (Farhat et al., 2006).

### 1.3.1.3 TT e o Fenômeno de hipersensibilidade tardia (HST)

Conhecido no passado como alergia tuberculínica, o fenômeno de hipersensibilidade tardia ocorre simultaneamente com o estabelecimento da imunidade específica da TB, portanto, relacionado à atividade de células linfocitárias. Após 2 a 8 semanas da infecção pelo *M. tuberculosis*, os linfócitos T sensibilizados pelos componentes do bacilo, a partir da injeção de um antígeno tuberculínico desencadeiam uma reação de vaso dilatação, edema e acúmulo de células no local. Entre 48 a 72 horas as células mobilizadas formam um nódulo que caracteriza a hipersensibilidade tardia (HST) (Daniel, 1980; Hernández-Pando et al., 2007; Barreto et al., 2008).

O fenômeno de hipersensibilidade tardia na tuberculose é um estado imunológico em que linfócitos e macrófagos são direta ou indiretamente sensíveis à tuberculina. A tuberculina em baixas e adequadas concentrações produz ativação de macrófagos, causando migração dessas células da corrente sanguínea para o sítio inflamatório (Dannenberg, 1999). Apesar de ocorrer quase simultaneamente com a imunidade mediada por célula T, o fenômeno de hipersensibilidade ocorre em resposta a tuberculina; a resposta de célula T em resposta a presença de lipoproteínas e lipopolissacarídeos. No homem a hipersensibilidade pode persistir por muitos anos após a cicatrização da lesão primária ou mesmo durar por toda a vida do indivíduo, pois, os linfócitos têm memória imunológica para a tuberculina. Outra razão é que os bacilos ou seus antígenos podem persistir dentro do foco caseoso ou na lesão cicatrizada. Escapes ocasionais do bacilo ou de seus produtos podem manter a hipersensibilidade por anos (Dannenberg, 1999; Melo et al., 2005).

### 1.3.2 Ensaio de Liberação de Interferon Gama (IGRA)

Breve consideração sobre a patogênese da doença é necessária para compreensão dos princípios do ensaio de liberação de interferon gama (IGRA, do inglês *interferon gamma release assay*).

Após a inalação do *M. tuberculosis* a primeira linha de defesa são os macrófagos alveolares, que podem muitas vezes causar a morte imediata do bacilo com liberação de radicais livres. A eficácia desse mecanismo depende da capacidade microbicida intrínseca dos macrófagos alveolares, da patogenicidade e virulência do bacilo e do microambiente inflamatório (Kaufmann, 2001). Os bacilos que sobrevivem no interior dos macrófagos alveolares e células dendríticas se multiplicam, assim, as células secretam mediadores inflamatórios como o TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 entre outros, que ativam os macrófagos. Os linfócitos T CD4+ e CD8+ juntamente com as células NK (*natural Killer*) em resposta principalmente à IL-12 e IL-18 produzem uma citocina pró-inflamatória de grande importância na infecção pelo *M. tuberculosis* o interferon gama, assim, esse ambiente já inflamado recruta ainda mais células periféricas para o pulmão. As células dendríticas são ativadas através dos TLRs (*toll-like receptors*), os monócitos se diferenciam em macrófagos e esses em células epitelioides e, finalmente, em células gigantes que se unem para formar o granuloma. O controle da multiplicação bacteriana ocorre pela interação de uma célula com a outra que contribui para organização do granuloma (compacto) evitando, assim, a proliferação dos bacilos. São importantes nesse processo entre outros o TNF-alfa, o IFN-gama e as quimiocinas cruciais para manter a resposta inflamatória no interior do granuloma. No futuro, se ocorrer falência desses mecanismos imunológicos de vigilância, ocorrerá a tuberculose pós-primária (Figura 1) (Fenhalls et al., 2002; Herrera et al., 2009; Ahmad, 2011). Desta forma podemos ver que o IFN- $\gamma$  tem participação em momentos diferentes da patogênese da TB, sendo possível sua dosagem no sangue periférico para o diagnóstico da infecção latente pelo *M. tuberculosis* (ILTb) e da tuberculose doença (Figura 2).

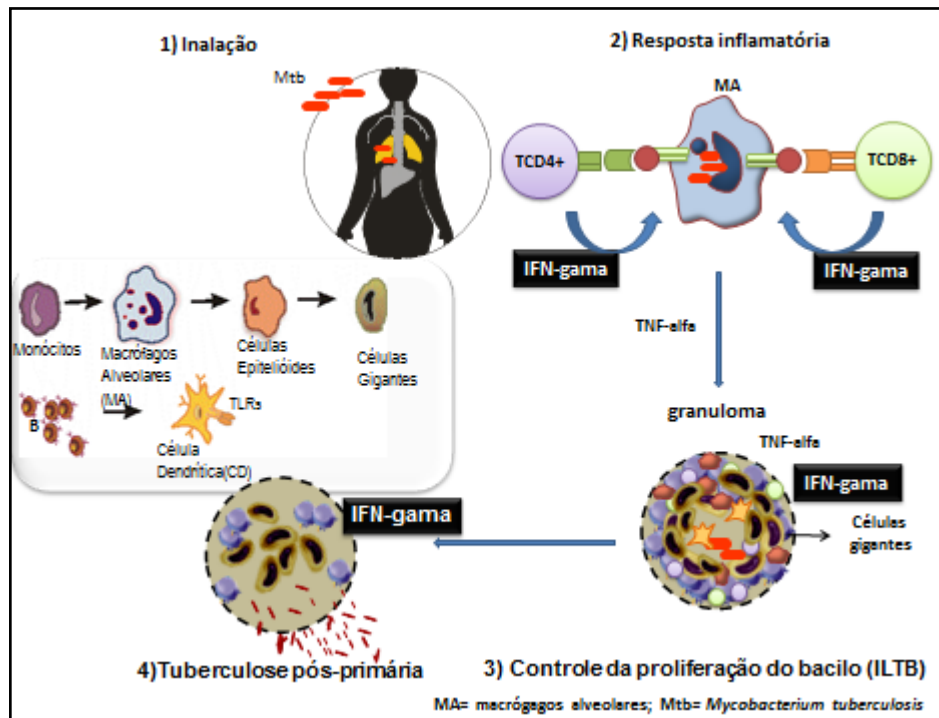


Figura 1. Patogênese da tuberculose e a participação do interferon gama.

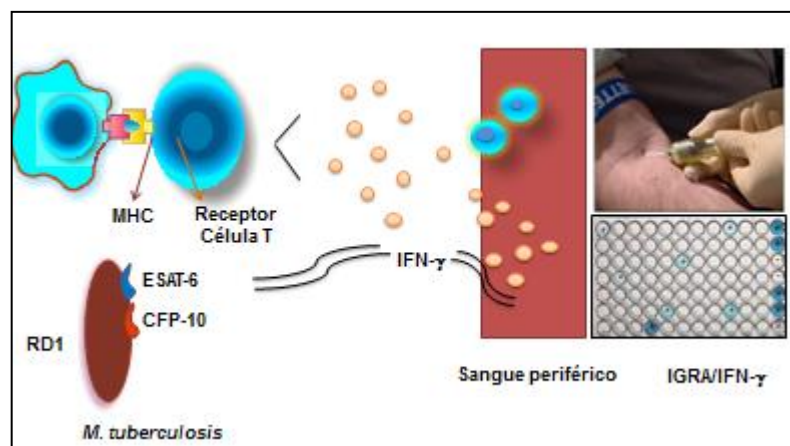


Figura 2. Apresentação de antígenos do Mtb, liberação de citocinas e dosagem de Interferon gama (IFN-γ) no sangue periférico.

Após um longo reinado do teste tuberculínico surge, em 2001, o primeiro ensaio de liberação de interferon gama (ELIG/IGRA) aprovado *pelo Food and Drug Administration* (FDA) para o reconhecimento da ILTB chamado de QuantiFERON®-TB test, baseado no próprio PPD. A mensuração dos níveis de interferon gama é realizada após estimulação *in vitro* de amostra de sangue total com o PPD e

antígenos de controle, utilizando a técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (Mazurek et al., 2010).

Este teste sofre interferência da vacinação com o BCG e não diferencia a infecção tuberculosa de outras micobactérias, com resultados falso-positivos. Assim, uma segunda geração de testes passou a utilizar antígenos mais específicos com a finalidade de melhorar a sensibilidade e especificidade do exame. A comparação do genoma de diferentes micobactérias levou a identificação da chamada região diferencial 1 (RD1), presente no *M. tuberculosis* e *M. bovis*, mas ausente no BCG, fruto das múltiplas passagens que a cepa vacinal sofreu (Mazurek et al., 2010).

Em 2005 surgiu o QuantiFERON®-TB gold In Tube (QFT-GIT), Cellestis, Carnegie, Austrália, que utiliza técnica de imunoensaio para medir a produção de IFN- $\gamma$ . Os antígenos utilizados no teste compreendem uma combinação de peptídeos que simulam as proteínas ESAT-6, CFP-10 e TB 7,7 (p4). O *Early Secretory Antigen Target 6* (ESAT-6) é um antígeno codificado e expresso pelo *M. tuberculosis*, *M. Kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum*, mas ausente no BCG. A *Culture Filtrate Protein 10* (CFP-10) é uma proteína específica do *M. tuberculosis*. Ensaio que utilizam estas proteínas como antígenos estimulam apenas linfócitos T, previamente sensibilizados pelas proteínas a produzirem interferon gama. A combinação de duas proteínas no mesmo ensaio aumenta a sensibilidade e especificidade do teste para o diagnóstico de ILTB (Cho, 2007; Dinnes et al., 2007; Nyendak et al., 2009; Mazurek et al., 2010; Anibarro et al., 2011).

Em 2007 foi aprovado o QFT-GIT e em 2008 o T-SPOT que utiliza ensaio imunoenzimático (ELISPOT) para detectar aumento do número de células que secretam interferon gama após estimulação com antígenos (representados por pontos em cada poço do teste). O FDA sugere uma interpretação do resultado do T-SPOT ( $\geq 8$ , 7, 6, 5,  $\leq 4$ ) de acordo com o número de SPOTS, resultando em POSITIVO, BORDERLINE e NEGATIVO. Este teste permite, ainda, a interpretação que conversões de negativos para positivos, poderiam representar infecção adquirida recentemente. Embora a sensibilidade destes testes seja similar ao TT, sua especificidade é superior, principalmente em populações vacinadas com BCG (Mazurek et al., 2010). Novos estudos sugerem que o IGRA na infecção aguda pelo

*M. tuberculosis*, apresente resultado positivo mais rápido que o teste tuberculínico (Anibarro et al., 2011).

Estudos realizados comparando o uso do IGRA e do TT para a detecção de ILTB demonstraram, de uma forma geral, que estes novos testes apresentam elevada especificidade, especialmente em populações submetidas à vacinação com BCG, e sensibilidade mais limitada (Menzies et al., 2007). Uma revisão sistemática avaliando estudos realizados com os dois testes comercializados foi publicada por Pai et al. (2008). Os estudos avaliados são transversais, a maioria avaliando indivíduos sem infecção pelo HIV e utilizando o diagnóstico de TB doença pela cultura como padrão-ouro (Pai et al., 2008).

Alguns estudos com o T-SPOT.TB (Oxford Immunotech, Abingdon, UK) que mede o interferon gama liberado pelas células mononucleares do sangue periférico em resposta aos antígenos específicos do complexo *M. tuberculosis*, não compartilhado com o bacilo BCG ou espécies ambientais da micobactéria, sugerem que o T-SPOT tem maior sensibilidade e menos resultados *borderline* ou indeterminado que o Quantiferon (Cattamanchi et al., 2011). A explicação seria porque o T-SPOT utiliza um número específico de células mononucleares do sangue periférico, e portanto, é menos afetado pelos baixos valores de células T CD4+, todavia outros estudos contestam essa observação (Richeldi et al., 2009; Talati et al., 2009).

Pesquisa realizada em Londres com 117 pacientes infectados pelo HIV, em acompanhamento ambulatorial, expostos a pacientes bacilíferos, ou seja, com risco de ILTB, comparou o Quantiferon-TB Gold IT com o T-STOP.TB e revelou baixa prevalência de resultados positivos do IGRA (Quantiferon positivo em 9,4% e T-SPOT positivo em 5,1%), taxa muito baixa de resultados indeterminados para o Quantiferon (<1%) e para o T-SPOT (0%); a concordância dos testes foi moderada com Kappa de 0,49 (95% intervalo de confiança = 0,21-0,77), quando os resultados indeterminados foram excluídos, o Kappa permaneceu moderado (0,558). Nesse estudo havia poucos pacientes com baixos valores de célula T CD4+ (mediana de 530 células/mm<sup>3</sup>), 90% usava TARV e 78% eram vacinados com BCG (Sultan et al., 2013). Considerações importantes em relação a esse estudo é que se trata de país com baixa prevalência de TB (Inglaterra) e com ótima infraestrutura para tratamento

do HIV e limitações do estudo são a baixa taxa de positividade do IGRA, tempo de seguimento curto (menos de dois anos), o teste tuberculínico não foi feito em todos os pacientes o que dificulta a identificação de preditores de resultados positivos e testes discordantes.

Estudos multicêntricos, com maior número de pacientes e com seguimento mais longo (cinco anos ou mais) são necessários para comparar o teste tuberculínico com o IGRA (Abubakar et al., 2013).

Em estudos transversais, a maioria com indivíduos sem infecção pelo HIV e utilizando o diagnóstico de TB doença pela cultura como padrão-ouro, que avaliaram os testes QuantiFERON®-TB Gold, QuantiFERON®-TB Gold In-Tube e T-SPOT®; as sensibilidades encontradas foram 78% (intervalo de confiança (IC)= 73%-82%) para o teste QuantiFERON®-TB Gold, 70% (IC= 63%-78%) para o QuantiFERON®-TB Gold In-Tube e 90% (IC= 86%-93%) para o T-SPOT®. A especificidade encontrada para ambos os testes QuantiFERON® foi 99% (IC= 98%-100%) em população não vacinada com BCG e 96% (IC= 94%-98%) em população vacinada com BCG. Para o teste T-SPOT a especificidade foi de 93% (IC= 86%-100%) (Pai et al., 2008; Mazurek et al., 2010). Desta forma, a principal vantagem dos IGRAs, além de necessitar apenas uma visita do indivíduo para a sua realização, é a maior especificidade para a detecção da ILTB especialmente em vacinados pelo BCG.

A OMS fez uma revisão dos estudos sobre o papel do IGRA em infectados pelo HIV, observando-se uma grande variação quanto ao desenho e a população dos estudos em países em desenvolvimento. Talvez a resposta, ainda não seja conhecida, todavia o diagnóstico da ILTB e seu tratamento quando indicado, têm grande importância para o controle da TB em pacientes com AIDS. A utilidade clínica de qualquer teste de diagnóstico para ILTB depende da sua capacidade de identificar quais os indivíduos que vivem verdadeiramente com maior risco de progressão para TB doença, e portanto, poderiam se beneficiar do diagnóstico e do tratamento.

Dados que tanto o TT e o IGRA têm sensibilidade subótima e que os resultados discordantes são frequentes, são observados quando ambos os testes são utilizados simultaneamente ou sequencialmente para o diagnóstico de ILTB. Todavia, em virtude da diminuição do desempenho do TT em imunodeprimidos,

acredita-se que o IGRA possa contribuir para identificar a ILTB especialmente em infectados pelo HIV com imunossupressão (World Health Organization, 2011b, 2011c).

### 1.3.2.1 O IGRA no diagnóstico da ILTB e da TB doença

Um dos desafios científicos é que o IGRA não é capaz de diferenciar ILTB de TB doença e devido à ausência de um padrão-ouro para o diagnóstico de ILTB, na maioria dos estudos a TB doença é utilizada como marcador para estimar o rendimento do IGRA na detecção da ILTB.

Os resultados demonstraram que, em países em desenvolvimento a sensibilidade do IGRA para diagnóstico da tuberculose doença entre indivíduos com suspeita de TB variou de 73 a 83% e a especificidade de 49 a 58%, ou seja, um em cada quatro pacientes, com cultura positiva para *Mycobacterium tuberculosis* poderia, ter IGRA negativo. Não houve evidência de que o IGRA seria um método complementar no arsenal de exames para o diagnóstico de TB doença, os exames microbiológicos convencionais ainda são a primeira escolha. Embora os dados sejam limitados, a sensibilidade do IGRA foi menor nos infectados pelo HIV (60 a 70%), sugerindo que quase um em cada três pacientes coinfectados HIV/TB tem IGRA negativo. Embora os estudos sejam bastante heterogêneos, não existem evidências consistentes para afirmar que o IGRA é mais sensível que o TT para o diagnóstico de TB doença. Quanto à especificidade para o diagnóstico da TB ativa, tanto o QuantiFERON® quanto o T-SPOT® demonstraram baixo desempenho independentemente da presença de infecção pelo HIV. Quanto ao valor preditivo do IGRA para o diagnóstico da TB doença em indivíduos infectados pelo HIV, o valor preditivo positivo é baixo (Clark et al., 2007; Aichelburg et al., 2009) e o valor preditivo negativo é alto (Aichelburg et al., 2009; Santin et al., 2012). Embora estes resultados possam sugerir que um resultado negativo do IGRA é seguro, os estudos tiveram sérias limitações, incluindo tamanhos pequenos de amostras com curta duração de acompanhamento e avaliação fraca dos diagnósticos diferenciais, além do acompanhamento de indivíduos com resultados positivos e negativos do IGRA

(Cattamanchi et al., 2011; Chen et al., 2011; Metcalfe et al., 2011; World Health Organization, 2011c).

Desta forma, os esforços nos países de baixa renda, a maioria com alta carga de TB, devem ser para utilização de métodos convencionais para o diagnóstico da tuberculose, especialmente nas formas pulmonares. Os estudos, inclusive as recomendações da OMS, apontam que a evidência para o uso do IGRA e do TT para o diagnóstico de TB doença é baixa, portanto, não recomendam esse teste (IGRA) para o diagnóstico da doença em países em desenvolvimento nos indivíduos infectados e não infectados pelo HIV (World Health Organization, 2011c).

Em revisão sistemática recente (Santin et al., 2012) a sensibilidade do IGRA confirmada por cultura para o *M. tuberculosis* foi menor do que a relatada em três metanálises incluindo predominantemente imunocompetentes (Diel et al., 2010; Metcalfe et al., 2011; Sester et al., 2011) e semelhante à observada em pacientes infectados pelo HIV em três revisões sistemáticas anteriores (Cattamanchi et al., 2011; Chen et al., 2011; Metcalfe et al., 2011). Esses dados em conjunto revelam sensibilidade do QFT-GIT de 65%, variando entre 61% (Cattamanchi et al., 2011) em países de baixa renda e 68% (Chen et al., 2011) em países de alta e baixa renda. Para o T-SPOT.TB, a sensibilidade foi em torno de 70%, 65% (Santin et al., 2012) e 72% (Cattamanchi et al., 2011) em países de baixa renda. Estudos com TB doença revelaram sensibilidade de 64 a 92% (Dheda et al., 2009; Ling et al., 2011). Estudo com 800 pacientes demonstrou que o TT é pelo menos tão sensível quanto o IGRA (QFT-GIT) (Rangaka et al., 2012).

A dificuldade de avaliar a acurácia dos testes confirmatórios para o diagnóstico da ILTB deve-se ao fato de não existir um teste “padrão-ouro”, no entanto, a aproximação da precisão, sensibilidade e especificidade podem ser feitas pelo estudo de populações com características conhecidas. Espera-se que comparando o IGRA com o TT para a detecção de ILTB em infectados pelo HIV, o IGRA apresente melhor especificidade que o TT.

A especificidade do IGRA e do TT em imunocompetentes vacinados com o BCG foi de 98,1% e 68,1% respectivamente. Pela dificuldade da interpretação do TT em pacientes infectados pelo HIV/AIDS com diferentes graus de imunodepressão, o IGRA poderá auxiliar o diagnóstico da ILTB nesta população, especialmente



naqueles com dosagem de células T CD4  $< 200/\text{mm}^3$ , em que o TT pode ser negativo (falso-negativo), espera-se que neste grupo o IGRA seja positivo.

Em infectados pelo HIV, em países com baixa carga de TB a associação entre IGRA positivo e desenvolvimento de TB em curto ou médio prazo foi modesta (Clark et al., 2007; Aichelburg et al., 2009), todavia o valor preditivo negativo do QFT-GIT foi alto (100%) (Aichelburg et al., 2009; Santin et al., 2012), contudo, esses estudos não podem ser extrapolados para países com alta carga de TB, onde estudos prospectivos são bem vindos (Lavani, Millington, 2007; Balcells et al., 2008; Conde et al., 2009; Lighter, Rigaud, 2009; Ministério da Saúde, 2011).

Segundo o NICE (*National Institute for Health and Clinical Excellence*) são indicações de realização do IGRA: pacientes com TT positivo imigrantes de países com alta incidência de TB; profissionais de saúde vacinados com BCG (alto risco de TB) e crianças contatos de bacilíferos. Nos pacientes infectados pelo HIV com contagem de células T CD4+ menor do que  $200 \text{ células}/\text{mm}^3$ , realiza-se TT e o IGRA a presença de TT ou IGRA positivos indica o tratamento, nos pacientes com contagem de células T CD4+ entre 200 e  $500 \text{ células}/\text{mm}^3$  (realiza-se o IGRA apenas ou IGRA e TT), naqueles com IGRA positivo ou IGRA e TT positivos também está indicado o tratamento da ILTB (National Institute for Health and Clinical Excellence, 2011).

A HPA (*Health Protection Agency*), em 2012 declarou sua posição sobre o uso do IGRA para ILTB. O TT persiste como teste de primeira escolha na investigação de ILTB para imunocompetentes contatos de bacilíferos e para os indivíduos que apresentam risco de infecção pelo MTb, se o TT for positivo considerar a realização do IGRA. O IGRA pode ser considerado como primeira escolha para investigação da ILTB para imigrantes de 16 a 35 anos, provenientes de países de alta incidência de TB; imigrantes candidatos a emprego na área da saúde; contatos de casos de surto de TB e para todos os imunossuprimidos (Health Protection Agency, 2012).

### 1.3.2.2 Impacto da depleção de linfócitos T CD4+ no resultado do IGRA

Com relação à sensibilidade do teste para o diagnóstico da doença ativa, estudo com o QFT-GIT observou redução da sensibilidade especialmente nos indivíduos com contagem de células T CD4+ < 200/mm<sup>3</sup> (Kabeer et al., 2009), porém, outro estudo relatou maior sensibilidade em pacientes com CD4 < 200 células/mm<sup>3</sup> (76%; 95% IC= 53-92) do que naqueles com CD4 + ≥ 200 células/mm<sup>3</sup> (61%; 95% IC= 36-83) (Ling et al., 2011). Outra pesquisa com QFT-GIT não encontrou diferença do resultado do teste de acordo com o CD4 (Kabeer et al., 2010). Os resultados com o T-SPOT.TB revelaram sensibilidade de 90% (95% IC= 67-99) em pacientes com CD4+ < 200 células /mm<sup>3</sup> ; e sensibilidade de 78 % (95% IC= 52-94 ) nos indivíduos com CD4+ ≥ 200 células/mm<sup>3</sup> (Ling et al., 2011).

Desta forma, com relação ao desempenho do IGRA de acordo com a contagem de células T CD4+, os dados são conflitantes, alguns demonstram maior sensibilidade na presença de CD4 < 200 células/mm<sup>3</sup> (Ling et al., 2011) outros, menor sensibilidade naqueles com CD4 < 200 células/mm<sup>3</sup> (Kabeer et al., 2009) e outros não demonstraram diferenças significativas (Kabeer et al., 2010; Oni et al., 2010; Chen et al., 2011). Resultados indeterminados também estão relacionados aos baixos valores de células T CD4+ (Talati et al., 2009; Cattamanchi et al., 2010; Chen et al., 2011).

### 1.3.2.3 Resultado indeterminado do IGRA

Algumas limitações do QFT-GIT que levam ao resultado indeterminado do teste são a presença de valores nulos superiores a 8UI/ml, pois, valores 25% acima do TB antígeno estariam fora do limite de detecção do ensaio. Outros motivos são quando não se respeita os passos descritos do ensaio; quando existe uma quantidade excessiva de IFN-gama na circulação; quando existem anticorpos heterófilos; quando é ultrapassado o limite do tempo (acima de 16 horas) desde a coleta da amostra até a incubação a 37°; se o sangue for armazenado em temperatura superior ou inferior aos limites indicados (22°C ± 5°C) ou se a placa de ELISA não for lavada adequadamente.

Estudos que relataram resultados indeterminados em pacientes testados com QFT-GIT (5209 participantes) a taxa de resultados indeterminados foi de 8,2% (95% IC= 6,0-11,2) (Tsiouris et al., 2006; Chee et al., 2008; Aichelburg et al., 2009; Kabeer et al., 2009; Garcia-Gasalla et al., 2010; Kabeer et al., 2010; Leidl et al., 2010; Sauzullo et al., 2010; Bua et al., 2011; Ling et al., 2011; Markova et al., 2011; Rangaka et al., 2012).

Resultados indeterminados podem ocorrer na presença de altos títulos de IFN- $\gamma$  presentes nos valores nulos ou seja superiores a 8 UI/ml (controle negativo) ou pela baixa produção de IFN- $\gamma$  no TB Mitógeno (controle positivo). Observou-se que a maioria dos resultados indeterminados do QFT-GIT ocorreu por baixa produção de IFN- $\gamma$  no controle positivo (90,8%). A taxa de resultados indeterminados do T-SPOT.TB na maioria dos estudos é em torno de 5,39% (95% IC= 3,5-9,8) e ocorreram por falha na execução do experimento; baixa produção de IFN- $\gamma$  do TB mitógeno (controle positivo) e por valores nulos elevados (acima de 8UI/ml) (Chee et al., 2008; Leidl et al., 2010; Chen et al., 2011; Ling et al., 2011; Markova et al., 2011). Estudos comparativos do QFT-GIT com o T-SPOT.TB, revelaram 5,7% e 6,1% de resultados indeterminados respectivamente (Chee et al., 2008; Leidl et al., 2010; Chen et al., 2011; Ling et al., 2011; Markova et al., 2011). A taxa de resultados indeterminados nos países de alta carga foi maior, 12,0% (95% IC= 8,6-16,4) para o QFT-GIT e 7,7% (95% IC= 3,6-15,5) para o T-SPOT.TB, em países de baixa carga a intermediária foi de 6,4% (95% IC= 1,1-12,9) para QFT-GIT e 3,5% (95% IC= 1,4-8,4) para o T-SPOT.TB.

Como vimos até 2001 o TT era o único teste disponível para avaliação de indivíduos com ILTB. Nos últimos anos o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) que sabidamente desempenha papel importante na resposta imunológica mediada por célula T em indivíduos infectados pelo *M. Tuberculosis*, ganhou espaço.

No Brasil, o IGRA ainda não está disponível para uso rotineiro no sistema único de saúde e o teste aprovado para uso é o QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold In Tube, entretanto, mais estudos são necessários para estimar o valor prognóstico do teste na identificação dos indivíduos com ILTB que apresentam maior risco de desenvolvimento de TB doença, ou seja, aqueles que mais se beneficiariam do tratamento da ILTB, especialmente na população de imunodeprimidos.

Assim, pela ausência de um teste ideal, especialmente nos infectados pelo HIV, nos propomos a estudar o comportamento de um teste para o diagnóstico da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* e para o diagnóstico da tuberculose doença, baseado na detecção in vitro da produção de interferon gama por linfócitos ativados após estimulação por antígenos específicos, pela técnica de ELISA (QuantiFERON®-TB Gold In Tube, Collestis, Carnegie, Austrália), comparando esse teste com o teste tuberculínico, em adultos infectados pelo HIV/AIDS.

## 2. OBJETIVOS

---

Comparar o desempenho do ensaio de liberação de interferon gama (IGRA) com o desempenho do teste tuberculínico (TT) em adultos infectados e não infectados pelo HIV sob risco de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

Comparar a sensibilidade do ensaio de liberação de interferon gama (IGRA) com a do teste tuberculínico (TT) nos indivíduos infectados pelo HIV com tuberculose doença.

### 3. MÉTODOS

---

Trata-se de estudo transversal com a finalidade de comparar dois testes (TT e IGRA) para detecção da infecção latente pelo *M. tuberculosis* e da tuberculose doença, realizado no período de dois anos.

### 3.1 Casuística

Indivíduos de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos, com risco de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (infectados e não infectados pelo HIV) e pacientes infectados pelo HIV com tuberculose doença, atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), no Instituto Clemente Ferreira (ICF) e nos Hospitais da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP). A seleção dos pacientes ocorreu no período de março de 2012 a abril de 2013.

O estudo foi iniciado após ser aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa das referidas instituições (Apêndice A). Os pacientes foram incluídos no estudo após esclarecimento e assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” TCLE (Apêndice B).

#### 3.1.1 Critérios de elegibilidade

- Idade superior a 18 anos.
- Indivíduos sob risco de infecção latente pelo *M. tuberculosis* infectados e não infectados pelo HIV (sem outra causa conhecida de imunodepressão).
- Pacientes com infecção pelo HIV e tuberculose doença.

#### 3.1.2 Critérios de exclusão

Pacientes com diagnóstico de outras micobactérias que não o *M. tuberculosis*; aqueles com outra causa conhecida de imunodepressão, incluindo *diabetes mellitus* tipo 1, neoplasias e/ou uso de medicações imunossupressoras; e os indivíduos que não compareceram para realizar a leitura do endurado até 96 horas após a aplicação da tuberculina.



### 3.2 Cálculo do tamanho da amostra

Estimando uma sensibilidade dos IGRAS nas populações de imunodeprimidos de 75% (inferior à sensibilidade de 80 a 90% descrita em adultos imunocompetentes), com um erro de 5% e um intervalo de confiança (IC) de 95% e contando com uma perda de leitura do TT de cerca de 15%, a amostra necessária de pacientes infectados ou não pelo HIV sob risco de ILTB e de pacientes infectados pelo HIV com TB doença (duas sub-populações) foi de cerca de 90 indivíduos em cada grupo (Mazurek et al., 2010).

### 3.3 Seleção da amostra

Inicialmente foram considerados elegíveis para o estudo 315 pacientes. Desses, 45 pacientes foram excluídos.

Do grupo 1 foram excluídos 13 pacientes: cinco por não retornarem para leitura do TT e 8 por falta de contagem de linfócitos T CD4+ e carga viral do HIV recentes (últimos três meses); do grupo 2 foram excluídos 20 pacientes: 15 por diagnóstico de micobacteriose não-tuberculosa, dois por outras causas de imunossupressão (*diabetes mellitus* tipo 1 e linfoma de Burkitt) e três por não concordarem em assinar o termo de consentimento; e do grupo 3 foram excluídos 12 pacientes: 7 por não retornarem para leitura do TT, três por outras causas de imunossupressão (dois por uso de fármacos imunossupressores e um por *diabetes mellitus* tipo 1) e dois por diagnóstico de TB doença (Diagrama 1).

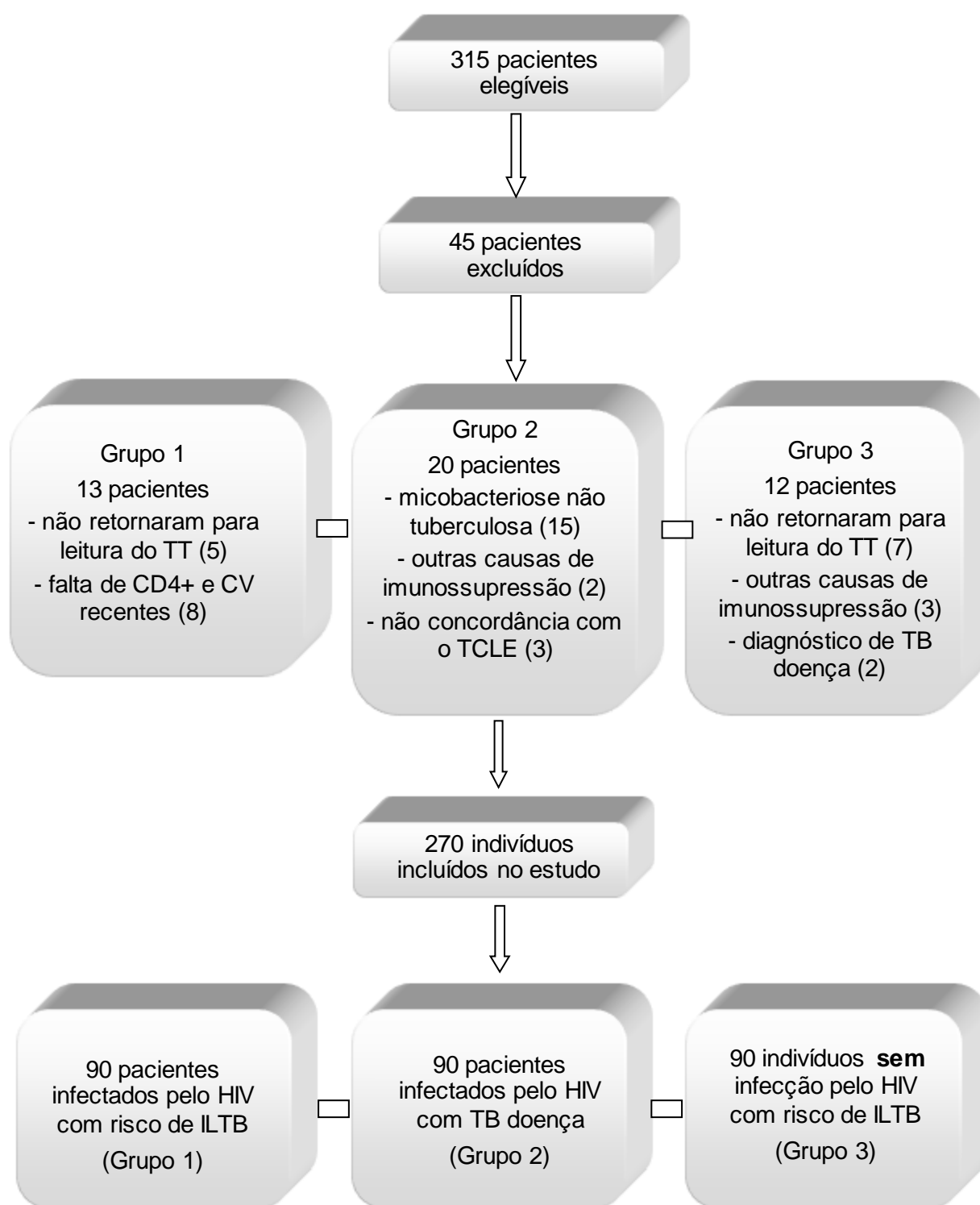


Diagrama 1. Seleção da Amostra

Assim, formaram esta amostra 270 pacientes, indivíduos sob risco de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (infectados e não infectados pelo HIV) ou pacientes com tuberculose doença (infectados pelo HIV), divididos em três grupos:

**Grupo 1:** Pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB, N=90.

**Grupo 2:** Pacientes infectados pelo HIV com tuberculose doença, N= 90.

**Grupo 3:** Indivíduos não infectados pelo HIV e sem outra causa conhecida de imunodepressão, com risco de ILTB, N=90.

### **3.4 Definição do risco de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ILTB) e de tuberculose doença**

#### **3.4.1 Definição de risco de ILTB**

Adotamos a definição de contato de Rose, que considera contato de pelo menos 200 horas de exposição a focos com escarro positivo para pesquisa de BAAR (bacilo álcool-ácido resistente) ou de, pelo menos, 400 horas a focos com BAAR negativo (ou não realizado) e cultura positiva, sendo valorizado apenas o contato no mesmo espaço físico (fechado) independentemente do local de contato (intradomiciliar ou extradomiciliar) (Rose et al., 1979; Conde et al., 2009). Deve-se considerar ainda a maior possibilidade de infecção com contatos mais breves nos imunodeprimidos (Centers for Disease Control and Prevention, 2005; World Health Organization, 2012).

Considerou-se contato intradomiciliar, aqueles indivíduos que dividem a mesma moradia por períodos noturnos ou por extensos períodos diurnos com o caso índice, antes do início do tratamento para tuberculose; e contato extradomiciliar pessoas que não dividem a moradia, mas dividem o mesmo espaço físico fechado no trabalho, durante atividades educacionais e ou sociais com o caso índice, antes do início do tratamento para tuberculose (World Health Organization, 2012).

Pela dificuldade de um padrão-ouro para o diagnóstico da infecção latente pelo *M. tuberculosis* (ILTB), especialmente nos infectados pelo HIV com baixos valores de células T CD4+, que comumente apresentam teste tuberculínico negativo (falso-negativo), considerou-se o critério risco de infecção pelo *M. tuberculosis*. Para definição do risco utilizou-se o questionário aplicado no estudo (Apêndice C), considerando-se o tipo de contato com o caso índice (intradomiciliar ou extradomiciliar), e se o indivíduo com TB ativa (caso índice) apresentava: tosse (> 3 semanas), febre (>38°C), sudorese noturna e ou perda não intencional recente de mais de 10% do peso corporal.

Considerou-se RISCO ALTO de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* aqueles com: (a) história de contato intradomiciliar com bacilíferos, e/ou (b) contato extradomiciliar com bacilífero nos últimos dois anos, associado aos seguintes sinais e sintomas do caso índice: tosse (> 3 semanas), somado, no mínimo, a um dos três critérios a seguir: (I) contato com indivíduos com perda não intencional recente de mais de 10% do peso corporal, (II) febre (>38°C) e (III) sudorese noturna. Para RISCO BAIXO considerou-se história de contato extradomiciliar com bacilífero nos últimos dois anos, associado a um dos seguintes sinais ou sintomas do caso índice: tosse (> 3 semanas) isoladamente, ou um ou mais dos seguintes critérios: contato com indivíduos com perda não intencional recente de mais de 10% do peso corporal, febre (>38°C) e sudorese noturna. Também foi considerado RISCO BAIXO indivíduos infectados pelo HIV sem história de contato com bacilíferos com TT positivo, e sem história de tratamento para ILTB (nos últimos dois anos).

Com o objetivo de obter um critério quantitativo para caracterizar indivíduos com Risco Alto ou Baixo de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, criou-se uma pontuação para cada uma das respostas afirmativas às perguntas do questionário aplicado no estudo. Seguindo esta pontuação, foram classificados com Risco Alto aqueles em que a soma dos pontos associados é maior ou igual a 10. Já para os casos em que a soma é menor ou igual 9, temos indivíduos com Risco Baixo (Quadro 1).

**Quadro 1. Classificação do risco de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis***

Perguntas		Pontuação (P)	
Contato	Intradomiciliar	10	
	Extradomiciliar	6	
Sinais ou sintomas do caso índice	Tosse (> 3 semanas)	3	
	Febre (>38°C)	1	
	Sudorese noturna	1	
	Perda de peso (> 10%)	1	
Soma dos pontos (S)		$S \geq 10$	RISCO ALTO
		$S \leq 9$	RISCO BAIXO

### 3.4.2 Definição da ILTB

Serão considerados casos de ILTB os pacientes com risco definido de ILTB, com pelo menos um dos testes positivos (teste tuberculínico ou IGRA), nos quais foi afastada tuberculose doença através da ausência de manifestações clínicas sugestivas e/ou alterações radiológicas sugestivas de tuberculose, e quando possível a coleta de baciloscopia no escarro, duas amostras negativas.

### 3.4.3 Diagnóstico da tuberculose doença

O diagnóstico de TB pulmonar ou extrapulmonar foi estabelecido pela positividade da baciloscopia e/ou cultura ou exame anatomopatológico compatível com tuberculose, conforme as normas do Ministério de Saúde do Brasil (Ministério da Saúde, 2011).

### 3.5 Procedimentos

Para obtenção dos dados clínicos e epidemiológicos, todos os participantes dos três grupos foram esclarecidos sobre a pesquisa, assinaram o TCLE, foram submetidos à consulta clínica (anamnese e exame físico) com obtenção de informações a partir do questionário, realizaram radiografia simples de tórax (RXT), coleta de sangue para o IGRA e após aplicação do teste tuberculínico (TT).

#### 3.5.1 Questionário

As seguintes informações foram buscadas: nome; registro na instituição; local de residência; idade; sexo; cor da pele; estado civil; profissão; antecedente pessoal de tuberculose (há mais de cinco anos); tratamento da ILTB: quando, por quanto tempo e os fármacos que foram utilizados; vacinação pelo BCG; avaliada pelo questionário e pelas cicatrizes vacinais, data da última vacinação; vacinação com vírus vivo; tempo de exposição a doentes tuberculosos em ambiente fechado, em horas diárias e duração (em meses); contato com indivíduos com TB tratada nos últimos dois anos, contato com indivíduos com TB não tratada, ou tratada irregularmente em qualquer tempo; contato com indivíduos com tosse crônica (> três semanas), febre (38°C), sudorese noturna e/ou perda de peso não intencional recente. Para pacientes com TB doença atual: febre por mais de 15 dias, especialmente se vespertina; tosse, perda de peso e sudorese noturna profusa; hemoptise; forma da tuberculose (pulmonar ou extrapulmonar). Para os indivíduos infectados pelo HIV: há quanto tempo foi feito o diagnóstico; condições de imunossupressão, tempo de terapia antirretroviral, fármacos utilizados, último valor (até três meses) da contagem de linfócitos T CD4+/T CD8+, último valor da carga viral do HIV (PCR quantitativo) (Apêndice C).

### 3.5.2 Procedimentos diagnósticos

#### 3.5.2.1 Teste tuberculínico

O TT foi realizado usando a técnica de Mantoux (Mantoux, 1912). Seringas plásticas e agulhas descartáveis de calibre 27 foram usadas para administração intradérmica de 0,1 ml do derivado proteico purificado (PPD-RT 23) equivalente a duas unidades tuberculínicas (2UT) - *Statens Serum Institute*, Copenhague, Dinamarca, no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo. A leitura feita 48-96 horas após a aplicação, usando o método de palpação do máximo diâmetro transversal do endurecido e utilizando régua em milímetros da Fundação Nacional de Saúde para mensuração. Para todos os indivíduos que participaram do estudo considerou-se reator quando o tamanho da endurecimento foi  $\geq 5$  milímetros. No grupo 2 (infectados pelo HIV com TB doença) realizou-se análises com tamanho da endurecimento  $\geq 5$  milímetros e  $\geq 10$  milímetros. A prova tuberculínica foi executada por profissionais previamente treinados. A padronização deste profissional teve como critério a concordância intra e interobservador (com profissional padrão) mínima de 80%. Tal medida tem por objetivo minimizar as variações de resultado decorrentes da aplicação e da leitura do teste tuberculínico.

#### 3.5.2.2 Ensaio de Liberação de Interferon Gama (ELIG/IGRA)

##### **IGRA (*Interferon Gamma Release Assay*)**

##### **QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT-GIT)**

A realização do teste seguiu as recomendações do laboratório do fabricante QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (Cellestis, Carnegie, Austrália), que constam das orientações que acompanham o produto. Os exames do projeto foram realizados no laboratório de imunologia do Instituto Clemente Ferreira (ICF) e no laboratório de imunologia da Disciplina de Infectologia da UNIFESP. Os profissionais do ICF, a pesquisadora e a bióloga que participou do estudo receberam treinamento para a realização do exame pela empresa responsável pela comercialização do produto no Brasil. O protocolo e as rotinas da pesquisa para realização e interpretação do teste estão disponíveis no Anexo 1 e Apêndice D, respectivamente.

Uma alíquota de 3,0 ml de sangue foi retirada por técnicos treinados. Três tubos foram marcados com o mesmo número de identificação do questionário do paciente: frasco controle negativo (tampa cinza), frasco revestido com antígenos específicos da tuberculose (tampa vermelha) (ESAT-6, CFP-10, TB7.7[p4]) e frasco controle positivo revestido com fitohemaglutinina como mitógeno (tampa roxa).

Todos os tubos foram transportados em um recipiente selado, de isopor, identificado com uma etiqueta como contendo material de risco biológico, e levados para o laboratório de referência (Laboratório do ICF), os gastos com o transporte do material ficaram a cargo das instituições que participam do estudo. Após a coleta e homogeneização, os tubos contendo o sangue foram transportados para o ICF e incubados a 37°C por 16-24 horas, sendo mantidos na posição vertical durante este período. Após 16 a 24 horas realizou-se a centrifugação dos tubos e em seguida o plasma foi separado e congelado a -70°C. Quando o número de pacientes necessários para realizar uma placa de ELISA (29 pacientes) ou duas placas (58 pacientes) era alcançado, realizava-se o ensaio de ELISA.

Cada paciente teve sua amostra de plasma avaliada para a produção de interferon gama por linfócitos após a estimulação por antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis*, antígenos inertes (controle negativo) e mitógenos (controle positivo). Após a obtenção dos valores brutos do ELISA, esses foram analisados a partir de um software específico para o QuantiFERON® – TB Gold In Tube e os resultados calculados. O programa avalia a qualidade das análises, gera uma curva *standard* e proporciona um resultado para cada indivíduo. O resultado final do teste pode ser positivo ou negativo. São considerados positivos aqueles com valores do TB antígeno menos o Nil (TB Ag- Nil) maior ou igual a 0,35 UI/ml. No estudo, o resultado “indeterminado” do IGRA, foi considerado como “positivo”.

### 3.5.2.3 Sorologia anti-HIV

Infecção pelo HIV foi diagnosticada por meio de dois testes positivos pelo método ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) e confirmada pelo teste *Western Blot*. Estes exames, utilizados para o diagnóstico da infecção pelo



HIV/AIDS, são realizados rotineiramente nos três centros em que os pacientes foram recrutados.

#### **3.5.2.4 Estudo radiológico do tórax**

Foi realizada radiografia simples de tórax (RXT) nas incidências pósterio-anterior e perfil dos indivíduos do estudo. Naqueles sob risco de ILTB para afastar TB doença e nos infectados pelo HIV com TB ativa para avaliação do envolvimento pulmonar. Tomografia Axial Computadorizada do Tórax foi realizada de acordo com a necessidade clínica, a critério do médico assistente de cada paciente. As definições utilizadas para os achados radiológicos foram baseadas nos estudos de Jones et al. (1997) e Gomes et al. (2003).

Definiu-se cavidade como coleção gasosa circunscrita, de parede individualizada, uni ou multiloculada, podendo ser única ou múltipla. Quando houve associação de infiltrado pulmonar e cavidade, considerou-se esta última como a manifestação principal. Padrão miliar na presença de opacidades pulmonares nodulares entre 1 e 3 milímetros de diâmetro, dispersas uniformemente em todo o parênquima pulmonar. Linfonomegalia mediastinal foi considerada quando houve aparecimento de densidades anormais e/ou alargamento do mediastino. Definiu-se derrame pleural quando os seios costofrênicos apareciam rasos ou apagados à radiografia de tórax. Considerou-se nódulo pulmonar a opacidade circular, única e de até três centímetros de diâmetro.

#### **3.5.2.5 Baciloscopia de escarro**

Realizada nos sintomáticos respiratórios quando houve material adequado para coleta. Realizada pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN), baseia-se na propriedade dos bacilos serem álcool-ácidos resistentes (BAAR), ou seja, depois de tingidos pela fucsina básica, manterem coloração vermelha ou rósea, mesmo após terem sido submetidos à ação de solução de ácido clorídrico a 3% em álcool para descoloração. Realizou-se exame semiquantitativo, com a contagem do número de BAAR por campo microscópico. Na lâmina de esfregaço pesquisou-se a presença

de BAAR em 100 campos, sendo o resultado expresso em cruzes: (-) resultado negativo, não foram encontrados BAAR em 100 campos observados; (+) presença de menos de um BAAR por campo, em 100 campos observados; (++) de um a 10 BAAR por campo, em 50 campos observados; (+++) mais de 10 BAAR por campo, em 20 campos observados (Ipuge et al., 1996; Castelo Filho et al., 2004; Ministério da Saúde, 2005; Conde et al., 2009; Ministério da Saúde, 2011).

### **3.5.2.6 Exame anatomopatológico (AP)**

Para o exame anatomopatológico obtiveram-se fragmentos de tecido (pulmonar, intestinal, hepático, linfonodal, laríngeo, mamário e pleural) mediante biópsia dos respectivos sítios. As amostras colhidas foram submetidas aos métodos rotineiros para microscopia óptica: fixação em formol a 10%, blocos de parafina cortados em micrótomo com 3 micra ( $\mu$ ) de espessura e corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE), Grocott (para a pesquisa de fungos) e Ziehl-Neelsen (para a pesquisa de BAAR). As biópsias foram processadas conforme rotina do laboratório de Anatomia Patológica do IIER e da ISCMSP.

Foi considerada característica de TB a presença de proliferação de macrófagos epitelioides constituindo granulomas confluentes com presença de células gigantes de Langhans com focos centrais de necrose caseosa e em torno infiltrado linfocitário, com pesquisa de BAAR positiva pelo método de Ziehl-Neelsen.

Na biópsia pleural consideraram-se para o diagnóstico de TB cortes histológicos, evidenciando abundante exsudato de fibrina com restos celulares e infiltrado focal linfohistiocitário com presença de necrose caseosa e algumas células gigantes de Langhans, e pesquisa de BAAR positiva pelo método de Ziehl-Neelsen.

## **3.6 Conduta após o resultado do TT e do IGRA**

Nos indivíduos sob risco de ILTB com TT+ e/ou IGRA+, após afastada doença em atividade (TB doença), foi recomendado ao médico que acompanhava o paciente o tratamento da ILTB de acordo com as normas do Ministério da Saúde (Conde et al., 2009; Ministério da Saúde, 2011).

### 3.7 Ética e Comitês de Ética em Pesquisa

O projeto foi encaminhado e aprovado pelos diferentes CEPs das instituições: UNIFESP, IIER e ISCMSP e pela diretoria técnica do ICF. Apenas indivíduos que consentiram participar através da assinatura do TCLE foram incluídos. Para os indivíduos que se recusaram a participar, foi mantida a assistência médica habitual, sem nenhuma restrição. Para todos os pacientes com infecção pelo HIV, contatos próximos de pacientes com TB que tiveram o diagnóstico de ILTB foi recomendado ao médico assistente, conforme as normas do MS, o tratamento da ILTB com isoniazida (H ou INH) na dose de 5-10 mg /kg de peso até 300 mg/dia por 6 meses; salvo contra-indicação ao uso do fármaco. No caso de adultos não infectados pelo HIV com ILTB, o caso foi discutido com o médico que acompanhava o paciente, e recomendado o tratamento da ILTB de acordo com as normas do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2008a; Conde et al., 2009; Ministério da Saúde, 2011).

### 3.8 Instituições participantes

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), Instituto Clemente Ferreira (ICF) e Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP).

### 3.9 Análise estatística

Análises descritivas foram realizadas, para melhor conhecimento sobre os dados do estudo. No caso de variáveis quantitativas, medidas de posição e dispersão foram utilizadas. Para variáveis qualitativas, percentuais dos grupos calculados.

Para estudar a associação entre o teste tuberculínico (TT) e o IGRA (no grupo 1 e no grupo 3), foram utilizados o teste de McNemar (avaliar se houve concordância) e o valor de Kappa (grau de concordância entre as variáveis) (Agresti, 2007).

Para avaliar os valores de células T CD4+ de acordo com o resultado do TT e do IGRA, utilizou-se o teste de Mann-Whitney (Agresti, 2007).

Para estudar a associação entre os exames (TT e IGRA) e o risco (no grupo 1 e grupo 3), utilizou-se o teste exato de Fisher (avaliar se houve associação entre as variáveis), o teste de McNemar (se houve concordância) e o valor de Kappa (grau de concordância) (Agresti, 2007).

A curva ROC (*receiver operating characteristic*) foi utilizada para verificar a possibilidade de identificar valores de corte de linfócitos T CD4+ e T CD8+, a partir dos quais seja possível otimizar a sensibilidade e a especificidade do TT e do IGRA e para resultados do IGRA (TB Ag-Nil) de acordo com o risco de ILTB, a partir dos quais seja possível otimizar a sensibilidade e a especificidade do IGRA.

Para avaliar o grau de concordância, utilizou-se o coeficiente de concordância Kappa. De acordo com os níveis de concordância considerou-se: que não houve concordância entre as variáveis quando o valor Kappa foi menor que 0,20; concordância fraca ou leve com valores de 0,21 a 0,40; concordância moderada valores de 0,41 a 0,60; concordância boa valores de 0,61 a 0,80 e concordância forte valores de 0,81 a 1. Um eventual valor de Kappa menor que zero, negativo, sugere que a concordância encontrada foi menor do que aquela esperada ao acaso (Altman, 1991).

Na análise dos resultados do grupo 2 (infectados pelo HIV/AIDS com TB doença) inicialmente, realizou-se análise descritiva dos dados. Para variáveis quantitativas, medidas de posição e dispersão foram utilizadas. No caso de variáveis qualitativas, percentuais foram calculados.

Avaliou-se a relação entre as variáveis CD4 e TB Ag - NIL utilizando o teste de correlação de Spearman. A concordância entre o TT e o IGRA foi avaliada pelo teste de McNemar. Avaliando-se a variável CD4, foram encontrados pontos de corte com objetivo de aumentar a sensibilidade do TT e do IGRA com gráficos e intervalos de confiança para as diferentes sensibilidades.

O nível de significância de 5% (0,050) foi adotado para a aplicação dos testes estatísticos. Utilizou-se o programa estatístico *Predictive Analytics SoftWare 17.0.2* (PASW Statistics 17.0.2).

## 4. RESULTADOS

---

## 4.1 Análise dos resultados do grupo 1 composto por 90 pacientes infectados pelo HIV sob risco de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ILTB)

### 4.1.1 Análise descritiva

#### 4.1.1.1 Variáveis quantitativas

No grupo 1, composto por 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB, a média de idade foi de 39,28 ( $\pm 10,91$ ) anos; os valores médios de células T CD4+ de 557,51 ( $\pm 283,89$ ) células/mm<sup>3</sup>; valores médios de células T CD8+ de 835,41 ( $\pm 331,79$ ) células/mm<sup>3</sup>; a relação CD4/CD8 de 0,71 ( $\pm 0,43$ ); os valores médios da carga viral do HIV de 514,69 ( $\pm 1814,02$ ) cópias/ml; os valores médios do log<sup>10</sup> da CV do HIV de 1,89 ( $\pm 0,55$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1. Descrição das médias, desvios-padrão, valores mínimos e valores máximos relativos às variáveis quantitativas (idade, contagem de linfócitos T CD4+, contagem de linfócitos T CD8+, razão CD4/CD8, carga viral do HIV, log<sup>10</sup> de carga viral do HIV, em 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Variável	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Idade	39,28	10,91	18,00	72,00
CD4	557,51	283,89	114,00	1.259,00
CD8	835,41	331,79	225,00	2.112,00
CD4/CD8	0,71	0,43	0,16	3,53
Carga Viral do HIV	514,69	1.814,02	50,00	10.023,00
log <sub>10</sub> (CV) do HIV	1,89	0,55	1,70	4,00

#### 4.1.1.2 Variáveis qualitativas

Nos 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ILTB), a maioria (64,44%) foi atendida no Instituto de Infectologia Emílio Ribas era do sexo masculino (56,67%), branco (57,78%), vacinado com BCG (95,56%) com cicatriz vacinal (95,56%), ninguém recebeu vacina

com vírus vivo no último mês e a maioria (76,67%) apresentava risco alto de infecção pelo *M. tuberculosis* (Tabela 2). A classificação do risco em alto e baixo esta descrita na seção 3.1.4.1 do capítulo 3 (Métodos).

**Tabela 2.** Descrição das frequências e respectivos percentuais relativos às variáveis qualitativas (instituição, sexo, cor da pele, vacinação com BCG, cicatriz vacinal, vacinação com vírus vivo e risco de infecção pelo *M. tuberculosis*) em 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo

Variável	Grupo	Frequência (n)	Percentual (%)
<b>Instituição</b>	IIER	58	64,44
	ISCMSP	32	35,56
<b>Sexo</b>	Feminino	39	43,33
	Masculino	51	56,67
<b>Cor de pele</b>	Amarelo	02	2,22
	Branco	52	57,78
	Negro	13	25,56
	Pardo	23	14,44
<b>Vacinação com BCG</b>	Não	04	4,44
	Sim	86	95,56
<b>Cicatriz vacinal</b>	Não	04	4,44
	Sim	86	95,56
<b>Vacinação com vírus vivo</b>	Não	90	100,00
<b>Risco</b>	Alto	69	76,67
	Baixo	21	23,33

IIER: Instituto de Infectologia Emílio Ribas. ISCMSP: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

A maioria dos indivíduos infectados pelo HIV com ILTB não apresentava comorbidades (54 pacientes, 60,0%) e usava terapia antirretroviral (84 pacientes, 93,33%).

## 4.1.2 Teste Tuberculínico (TT) e Ensaio de Liberação de Interferon gama (IGRA)

### 4.1.2.1 Resultados do TT e do IGRA

Quanto aos exames realizados o teste tuberculínico foi positivo em 65,56% e o IGRA em 83,33% dos pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Tabela 3).

**Tabela 3. Descrição das frequências e respectivos percentuais relativos ao resultado do TT e do IGRA em 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Variável	Grupo	Frequência (n)	Percentual (%)
TT	Negativo	31	34,44
	Positivo	59	65,56
IGRA	Negativo	15	16,67
	Positivo	75	83,33

TT: teste tuberculínico. IGRA: ensaio de liberação de interferon gama.

### 4.1.2.2 Associação entre o TT e o IGRA

Na associação do TT e do IGRA, observa-se que 54 pacientes apresentaram TT e IGRA positivos e apenas 10 pacientes apresentaram os dois testes negativos; a maior discordância ocorreu nos casos com TT negativo e IGRA positivo (21 pacientes) (Tabela 4).

Para avaliar a associação entre o TT e o IGRA, utilizamos os testes de concordância de McNemar e Kappa (Agresti, 2007). O teste de McNemar mostrou que não houve concordância entre o TT e o IGRA ( $p=0,003$ ). O valor Kappa revelou fraca concordância entre o TT e o IGRA (Kappa: 0,271, 90% IC: 0,116-0,426).



**Tabela 4. Descrição das frequências relativas à associação do resultado do TT e do IGRA em 90 pacientes infectados pelo HIV sob risco de ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

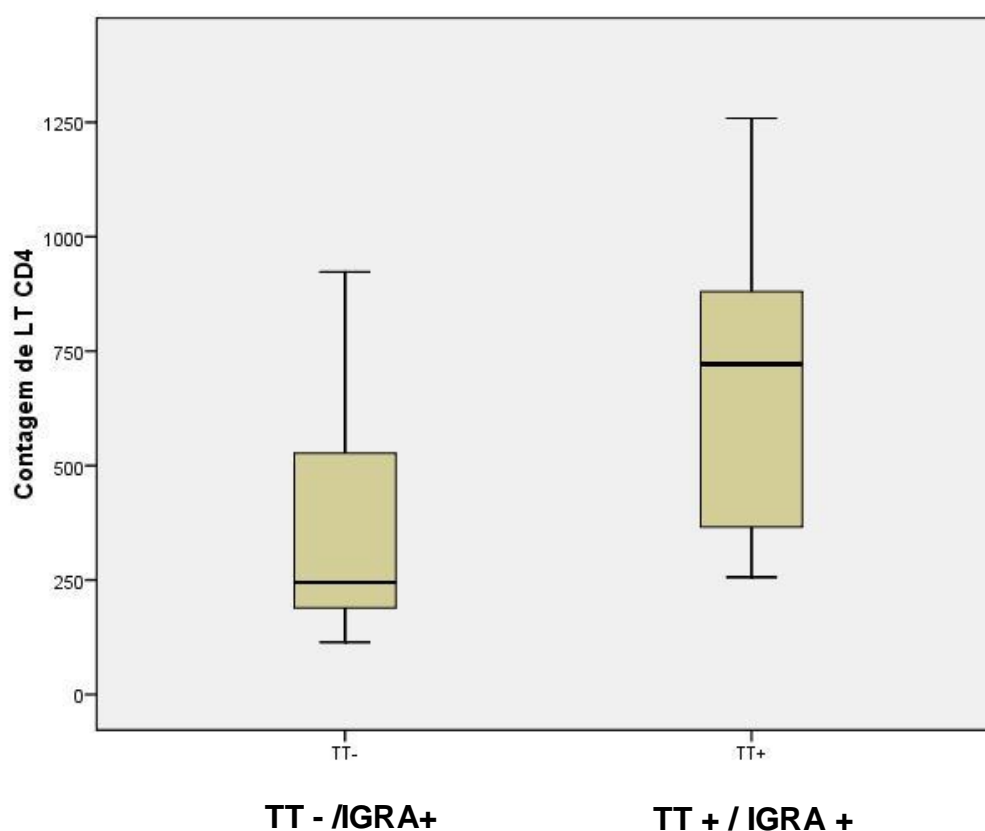
		TT		Total
		Negativo	Positivo	
IGRA	Negativo	10	5	15
	Positivo	21	54	75
Total		31	59	90

TT: teste tuberculínico. IGRA: ensaio de liberação de interferon gama.

TT e IGRA (McNemar,  $p=0,003$ ).

TT e IGRA (Kappa: 0,271, 90% IC: 0,116-0,426).

Observou-se que nos 21 pacientes que apresentaram TT negativo e IGRA positivo, a mediana da contagem de células T CD4+ foi de 245 células/mm<sup>3</sup>, enquanto que aqueles que apresentaram TT e IGRA positivos (54 pacientes) a mediana da contagem de células T CD4+ foi de 721,50 células/mm<sup>3</sup> (Figura 3).



**Figura 3. Diagrama de caixas (Boxplot) da contagem de linfócitos T CD4 + de acordo com o resultado do TT e do IGRA em 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.**

A mediana de linfócitos T CD4 no grupo discordante (TT negativo e IGRA positivo) foi significativamente menor que a do grupo em que há concordância entre os testes ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney).

#### 4.1.2.3 Avaliação dos resultados do TT e do IGRA de acordo com o diagnóstico de ILTB

Apenas 10 pacientes apresentaram TT e IGRA negativos, portanto não preencheram os critérios do estudo para o diagnóstico de ILTB. Nesse grupo a média de idade foi de 41 anos; a média do tempo de exposição à bacilíferos foi de 1,7 meses; a média dos valores de células T CD4+ foi de 415 células/mm<sup>3</sup>. Todos os pacientes recebiam TARV e apresentavam carga viral indetectável.

Assim, 80 pacientes infectados pelo HIV preencheram os critérios do estudo para o diagnóstico de ILTB (risco definido de ILTB e pelo menos um dos testes positivos, TT ou IGRA). Observou-se que o TT foi positivo em 59 pacientes (73,75%) e negativo em 21 (26,25%) (Tabela 5), o IGRA foi positivo em 75 pacientes (93,75%) e negativo em cinco pacientes (6,25%) (Tabela 6).

Para avaliar o grau de concordância entre o resultado dos testes (TT e IGRA) e o diagnóstico de ILTB, utilizou-se o coeficiente de concordância Kappa. O TT demonstrou fraca concordância (Kappa: 0,384) e o IGRA boa concordância com o diagnóstico de ILTB (Kappa: 0,769).

**Tabela 5. Descrição das frequências relativas ao resultado do TT de acordo com o diagnóstico de ILTB em 90 pacientes infectados pelo HIV sob risco de ILTB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Variável	Grupo	ILTB		Total
		Ausente	Presente	
TT	Negativo	10	21	31
	Positivo	0	59	59
	Total	10	80	90

TT: Teste Tuberculínico. ILTB: Infecção latente pelo *M. tuberculosis*.  
TT e ILTB (Kappa: 0,384).

**Tabela 6. Descrição das frequências relativas ao resultado do IGRA de acordo com o diagnóstico de ILTB em 90 pacientes infectados pelo HIV sob risco de ILTB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Variável	Grupo	ILTB		Total
		Ausente	Presente	
IGRA	Negativo	10	5	15
	Positivo	0	75	75
	Total	10	80	90

IGRA: ensaio de liberação de interferon gama. ILTB: Infecção latente pelo *M. tuberculosis*.  
IGRA e ILTB (Kappa: 0,769).

#### **4.1.2.4 Avaliação dos resultados do TT e do IGRA de acordo com o risco de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Risco)**

Estudo do comportamento do TT e do IGRA, utilizando como padrão-ouro o risco já descrito no capítulo 3 (métodos).

##### **4.1.2.4.1 TT e Risco**

Nos infectados pelo HIV sob risco de ILTB, o teste tuberculínico foi positivo em 48 e negativo em 21 de 69 pacientes com risco alto, e foi positivo em 11 e negativo em 10 de 21 pacientes com risco baixo (Tabela 7).

Para avaliar a possibilidade de associação do resultado do TT, de acordo com o risco, nos pacientes do grupo 1 foi realizado o teste exato de Fisher (Agresti, 2007). Não houve evidência estatística de associação entre o TT e o risco ( $p=0,191$ ).

**Tabela 7. Descrição das frequências relativas ao resultado do teste tuberculínico (positivo ou negativo), conforme o risco de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* nos pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

TT	Risco		Total
	Alto	Baixo	
<b>Positivo</b>	48	11	59
<b>Negativo</b>	21	10	31
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>21</b>	<b>90</b>

TT: teste tuberculínico.

TT e risco (Fisher,  $p=0,191$ ).

TT e risco (Kappa: 0,147, 90% IC:0,000-0,315).

#### 4.1.2.4.2 IGRA e Risco

Quando os pacientes foram avaliados, de acordo com o resultado do IGRA (positivo ou negativo) conforme o risco de infecção pelo *M. tuberculosis*, observou-se que de 69 pacientes com risco alto, 68 apresentaram IGRA positivo e de 21 pacientes com risco baixo, 14 apresentaram IGRA negativo (Tabela 8).

Para avaliar a possibilidade de associação do resultado do IGRA, de acordo com o risco, nos pacientes do grupo 1 foi realizado o teste exato de Fisher (Agresti, 2007). Diferente do que ocorreu entre o TT e o risco (não houve evidência estatística de associação), quando avaliado o IGRA de acordo com o risco, observou-se fortes evidências da presença da associação ( $p<0,001$ ).

**Tabela 8. Descrição das frequências relativas ao resultado do IGRA (positivo ou negativo), conforme o risco de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* nos 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

IGRA	Risco		Total
	Alto	Baixo	
<b>Positivo</b>	68	7	75
<b>Negativo</b>	1	14	15
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>21</b>	<b>90</b>

IGRA: ensaio de liberação de interferon gama.

IGRA e risco (Fisher,  $p<0,001$ ).

IGRA e risco (Kappa: 0,724, 90% IC:0,555-0,894).

Para avaliar a concordância entre o TT, IGRA e o risco, os testes de McNemar e Kappa foram utilizados. Observa-se que não houve evidência estatística para rejeitar a hipótese de concordância entre cada exame e o risco de infecção pelo *M. tuberculosis*. O teste de McNemar não rejeitou a hipótese de que a sensibilidade e o valor preditivo positivo do TT e o IGRA sejam iguais ( $p=0,112$  e  $p=0,077$ , respectivamente).

Quando o Kappa foi utilizado, observou-se que não houve concordância entre o TT e o risco (Kappa: 0,147, 90% IC:0,000-0,315) e uma boa concordância entre o IGRA e o risco (Kappa: 0,724, 90% IC:0,555-0,894). O intervalo de confiança sugere que a concordância entre as variáveis foi boa.

Quando utilizou-se a curva ROC (*receiver operating characteristic*) para verificar valores de corte do resultado do IGRA (TB Ag-Nil) de acordo com o risco de infecção pelo *M. tuberculosis*, adotou-se o ponto de corte do TB Ag-Nil de 0,51 UI/mL, onde obteve-se sensibilidade de 98,6% e especificidade de 71,4% (Figura 4).

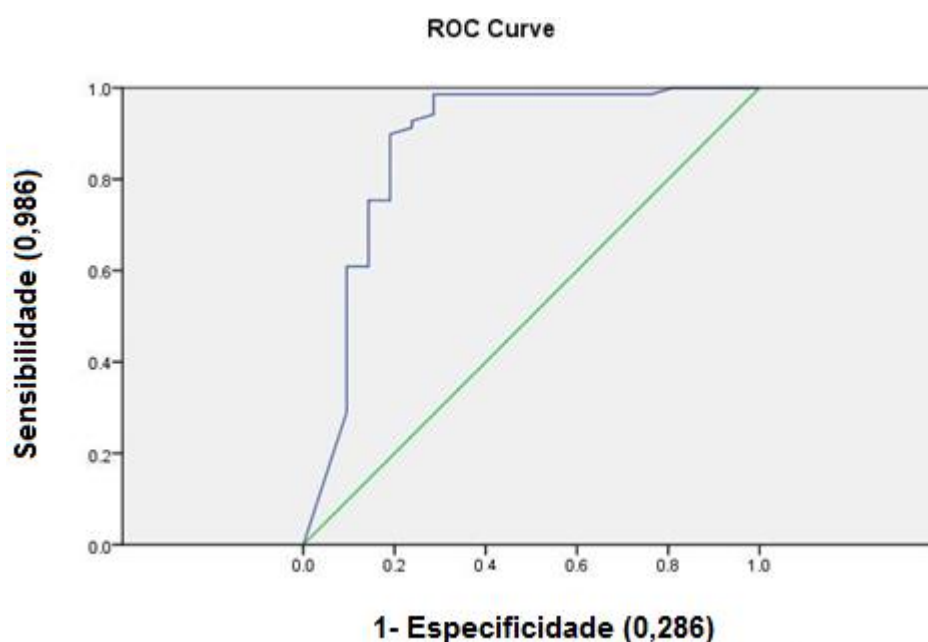


Figura 4. Apresentação da curva ROC para os resultados do IGRA (TB Ag-Nil) de acordo com o risco de infecção pelo *M. tuberculosis* nos pacientes do grupo 1 (infectados pelo HIV com risco de ILTB), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.

#### 4.1.2.4.3 Associação do TT e do IGRA de acordo com o Risco

Na associação do TT e do IGRA de acordo com risco, observa-se que apenas seis pacientes com risco baixo apresentaram TT e IGRA positivos e 48 pacientes com risco alto apresentaram os dois testes positivos (Tabela 9 e 10).

**Tabela 9. Descrição das frequências relativas ao resultado do TT e do IGRA nos pacientes infectados pelo HIV com baixo risco de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (21 pacientes), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Risco			TT		Total
			Negativo	Positivo	
Baixo	IGRA	Negativo	9	5	14
		Positivo	1	6	7
		Total	10	11	21

TT: teste tuberculínico. IGRA: ensaio de liberação de interferon gama.

**Tabela 10. Descrição das frequências relativas ao resultado do TT e do IGRA nos pacientes infectados pelo HIV com alto risco de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (69 pacientes), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Risco			TT		Total
			Negativo	Positivo	
Alto	IGRA	Negativo	1	0	1
		Positivo	20	48	68
		Total	21	48	69

TT: teste tuberculínico. IGRA: ensaio de liberação de interferon gama.

#### 4.1.2.4.4 Sensibilidade (Se), Especificidade (Es), Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN) do TT e do IGRA de acordo com o Risco nos pacientes infectados pelo HIV com ILTB

Baseado nos resultados apresentados na Tabela 7 e 8, foram estimadas as medidas de sensibilidade (Se), especificidade (Es), valor de preditivo positivo (VPP) e valor de preditivo negativo (VPN) para o TT e o IGRA, considerando o risco como padrão-ouro em 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB. As estimativas e os intervalos de confiança, para essas medidas, são apresentados na Tabela 11.

Considerando-se o TT, de acordo com o risco de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* nos pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB, a sensibilidade do exame foi de 69,57% (95% IC: 57,31-80,08), a especificidade de 47,62% (95% IC: 25,71-70,22), o VPP de 81,36% (95% IC: 69,09-90,31) e o VPN de 32,26% (95% IC: 16,68-51,37). Assim, o TT foi capaz de detectar ILTB em 69,57% das vezes, detectar que o paciente não está com ILTB em apenas 47,62% das vezes, a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com prognóstico positivo para infecção latente foi de 81,36% e a proporção de verdadeiros negativos foi baixa (32,26%).

Em relação ao IGRA, de acordo com o risco nos pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB, a sensibilidade foi de 98,55% (95% IC: 92,19-99,96), especificidade de 66,67% (95% IC: 43,03-85,41), VPP de 90,67% (95% IC: 81,71-96,16) e VPN de 93,33% (95% IC: 68,05-99,83). Desta forma, o IGRA foi capaz de detectar ILTB em 98,55% das vezes, detectar que o paciente não está com ILTB em 66,67% das vezes, aqueles com IGRA positivo têm grande chance (90,67%) de ter infecção latente pelo *M. tuberculosis* (VPP) e aqueles com IGRA negativo têm 93,33% de chance de não apresentar ILTB (VPN) (Tabela 11).

**Tabela 11. Estimativas e intervalos de confiança, nível de 95%, para as médias de sensibilidade (Se), especificidade (Es), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do TT e IGRA, utilizando o risco como padrão-ouro nos 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB (Grupo1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Exame	Medida	Estimativa	IC 95%	
TT	Se	69,57	57,31	80,08
	Es	47,62	25,71	70,22
	VPP	81,36	69,09	90,31
	VPN	32,26	16,68	51,37
IGRA	Se	98,55	92,19	99,96
	Es	66,67	43,03	85,41
	VPP	90,67	81,71	96,16
	VPN	93,33	68,05	99,83

TT: teste tuberculínico; IGRA: ensaio de liberação de interferon gama; Se: sensibilidade; Es: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

Após a realização dos exames do estudo 74,44% dos pacientes receberam tratamento da ILTB e a maioria recebeu isoniazida (95,71%) (Tabela 12).

**Tabela 12. Descrição das frequências e respectivos percentuais relativos ao tratamento para ILTB atual e fármaco utilizado em 90 pacientes infectados pelo HIV com ILTB (Grupo 1), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas três instituições do estudo**

Variável	Grupo	Frequência (n)	Percentual (%)
Tto. ILTB Atual	Não	23	25,56
	Sim	67	74,44
Fármaco utilizado	Isoniazida	64	95,71
	Não	03	4,29

Tto. ILTB Atual: tratamento da infecção latente pelo *M. tuberculosis* atual.

## 4.2 Análise dos resultados do grupo 2 composto por 90 pacientes infectados pelo HIV com tuberculose doença

### 4.2.1 Análise descritiva

#### 4.2.1.1 Variáveis quantitativas

A média de idade dos indivíduos infectados pelo HIV com TB doença foi de 39,01 ( $\pm 10,81$ ) anos, o valor médio de células T CD4 + de 198,92 ( $\pm 206,21$ ) células/mm<sup>3</sup>, valor médio de células T CD8 + de 529,58 ( $\pm 321,91$ ) células/mm<sup>3</sup>, a razão CD4/CD8 de 0,36 ( $\pm 0,32$ ), média da carga viral do HIV de 104.712,97 ( $\pm 164.230,65$ ) cópias/ml, a média do log<sup>10</sup> carga viral do HIV de 3,63 ( $\pm 1,57$ ) (Tabela 13).

**Tabela 13. Descrição dos valores médios, mínimos, máximos e desvios-padrão da idade, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, relação CD4/CD8, carga viral do HIV, log<sup>10</sup> (CV) do HIV, em 90 pacientes coinfectados pelo HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013**

Variável	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Idade	39,01	10,81	18,00	71,00
CD4	198,92	206,21	2,00	891,00
CD8	529,58	321,91	63,00	1.645,00
CD4/CD8	0,36	0,32	0,00	1,43
Carga Viral	104.712,97	164.230,65	50,00	500.000,00
log <sub>10</sub> (CV)	3,63	1,57	1,70	5,70

50,00: carga viral indetectável.



#### 4.2.1.2 Variáveis qualitativas

A maioria dos pacientes infectados pelo HIV com TB doença pertencia ao Instituto de Infectologia Emílio Ribas (80%), eram do sexo masculino (60%), brancos (54,44%), vacinados com BCG na infância (88,89%), cicatriz vacinal do BCG (87,78%) (Tabela 14).

**Tabela 14. Distribuição das frequências e dos respectivos percentuais das instituições que os pacientes pertenciam (Instituto Clemente Ferreira, ICF; Instituto de Infectologia Emílio Ribas, IIER; Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, ISCMSP); sexo; cor da pele; vacinação com BCG; cicatriz vacinal do BCG; vacinação com vírus vivo em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013**

Variável	Grupo	Frequência (n)	Percentual (%)
Instituição	ICF	2	2,22
	IIER	72	80,00
	ISCMSP	20	17,78
Sexo	Feminino	36	40,00
	Masculino	54	60,00
Cor de pele	Branco	49	54,44
	Negro	19	21,11
	Pardo	22	24,44
Vacinação com BCG	Não	10	11,11
	Sim	80	88,89
Cicatriz vacinal	Não	11	12,22
	Sim	79	87,78
Vacinação com vírus vivo	Não	88	97,78
	Sim	2	2,22

IIER: Instituto de Infectologia Emílio Ribas. ISCMSP: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

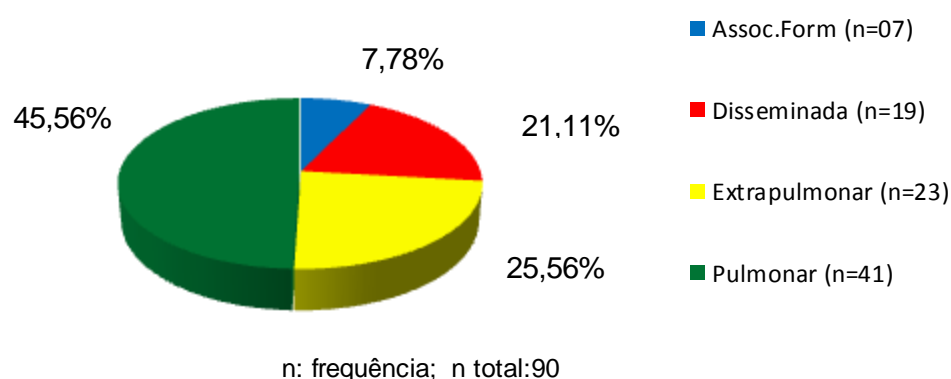
#### 4.2.2 Formas Clínicas da tuberculose

Quanto às formas clínicas da tuberculose a forma pulmonar ocorreu em 41 (45,56%) casos, extrapulmonar em 23 (25,56%), disseminada em 19 (21,11%) e associação de formas em 7 (7,78%) (Tabela 15 e Figura 5).

**Tabela 15. Distribuição das frequências e dos respectivos percentuais das formas clínicas da tuberculose em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013**

Variável	Grupo	Frequência (n)	Percentual (%)
Formas clínicas	Pulmonar	41	45,56%
	Extrapulmonar	23	25,56%
	Disseminada	19	21,11%
	Associação Formas	7	7,78%

Associação de Formas: pulmonar + ganglionar ou pulmonar + pleural.



**Figura 5. Gráfico de setor circular para apresentação das frequências e respectivos percentuais das formas clínicas da tuberculose em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013.**

Das formas extrapulmonares, a mais frequente foi a linfonodal (69,57%) seguida da neurológica (17,39%), mal de Pott (8,70%), intestinal (4,35%) (Tabela 16 e Figura 6).

**Tabela 16. Distribuição das frequências e respectivos percentuais das formas da TB extrapulmonar, em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013**

Variável	Grupo	Frequência (n)	Percentual (%)
TB Extrapulmonar	Linfonodal	16	69,57
	Neurológica	4	17,39
	Mal de POTT	2	8,70
	Intestinal	1	4,35

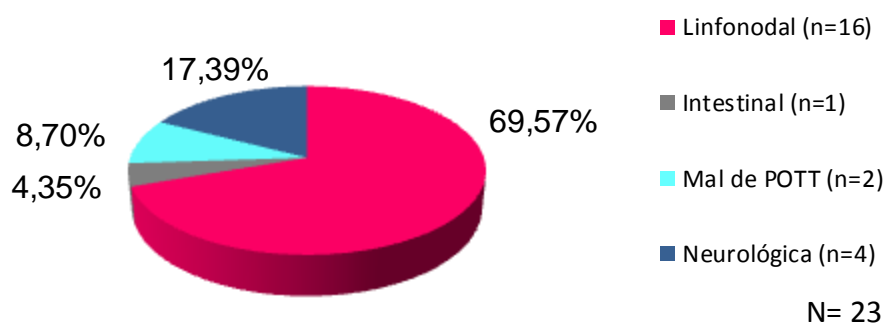


Figura 6. Gráfico de setor circular para apresentação das frequências e respectivos percentuais das formas extrapulmonares da TB em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença selecionados entre março/2012 e abril/2013.

#### 4.2.2.1 Sinais e sintomas compatíveis com a tuberculose

Quanto aos sinais e sintomas clínicos compatíveis com a TB, estavam presentes: febre (83,3%), febre vespertina (56,7%), tosse (66,7%), perda de peso maior que 10% do peso habitual (85,6%), sudorese (60%) e hemoptise (11,1%) (Tabela 17).

Tabela 17. Distribuição das frequências e respectivos percentuais relativos aos sinais e sintomas clínicos compatíveis com tuberculose doença em 90 pacientes infectados pelo HIV selecionados entre março/2012 e abril/2013

Variável	Frequência (n)	Percentual (%)
Perda de peso	77	85,56
Febre+15dias	75	83,33
Tosse	60	66,67
Sudorese	54	60,00
Febre vespertina	51	56,67
Hemoptise	10	11,11

#### 4.2.3 Método utilizado para o diagnóstico da tuberculose

Para o diagnóstico da TB utilizou-se somente a baciloscopia (BAAR) em apenas 3 (3,33%) casos; somente a cultura em 20 (22,22%); somente o exame anatomopatológico em 11 (12,22%); baciloscopia e cultura em 45 (50%); cultura e anatomopatológico em 4 (4,45%); baciloscopia, cultura e anatomopatológico em 7 (7,78%). A cultura isoladamente ou em associação foi o método diagnóstico mais utilizado (84,45%) (Tabela 18).

**Tabela 18.** Distribuição das frequências e respectivos percentuais do método utilizado para a confirmação do diagnóstico da TB: baciloscopia (BAAR); cultura; exame anatomopatológico; baciloscopia e cultura; cultura e anatomopatológico; baciloscopia, cultura e anatomopatológico, em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013

Métodos diagnósticos	Frequência (n)	Percentual (%)
Baciloscopia (BAAR+)	3	3,33
Cultura	20	22,22
Anatomopatológico	11	12,22
Baciloscopia (BAAR+) e cultura	45	50,00
Cultura e anatomopatológico	4	4,45
Baciloscopia (BAAR+), cultura e anatomopatológico	7	7,78
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>

BAAR = bacilo álcool-ácido resistente.

#### 4.2.3.1 Local de isolamento do *Mycobacterium tuberculosis*

O escarro foi o local em que mais foi encontrado o bacilo (53,33%), seguido de linfonodos (12,23%) e sangue (10%) (Tabela 19).

**Tabela 19.** Distribuição das frequências e dos percentuais referentes ao local de isolamento do agente etiológico em 90 pacientes infectados pelo HIV com tuberculose doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013

Variável	Grupo	Frequência(n)	Percentual(%)
Isolamento do agente (sítio)	Escarro	48	53,33
	Linfonodo	11	12,23
	Sangue	9	10,00
	Escarro+linfonodo	5	5,56
	LCR	5	5,56
	LBA	4	4,44
	Medula óssea	4	4,44
	Osso	2	2,22
	Mama	1	1,11
	Intestino	1	1,11

Isolamento do agente sítio: local em que o bacilo foi encontrado. LBA: lavado broncoalveolar. LCR: líquido.

#### 4.2.4 Uso de terapia antirretroviral (TARV)

Quanto ao uso de TARV nesse grupo, 57 pacientes (63,33%) recebiam e 33 (36,67%) não recebiam.

#### 4.2.5 Teste tuberculínico (TT) e Ensaio de Liberação de Interferon Gama (IGRA)

##### 4.2.5.1 Resultado do teste tuberculínico e do IGRA

Com ponto de corte de 5 mm o teste tuberculínico foi positivo em 25,56% dos pacientes e com ponto de corte de 10 mm o TT foi positivo em apenas 16,67%. O IGRA foi positivo em 65,56% dos pacientes infectados pelo HIV com TB doença (Tabela 20).

**Tabela 20. Distribuição das frequências e dos percentuais referentes ao resultado do teste tuberculínico (com ponto de corte de 5 mm e de 10 mm) e resultado do IGRA em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013**

Variável	Resultado	Frequência (n)	Percentual (%)
TT (PPD5)	Negativo	67	74,44
	Positivo	23	25,56
TT (PPD10)	Negativo	75	83,33
	Positivo	15	16,67
IGRA	Negativo	31	34,44
	Positivo	59	65,56

TT (PPD5): teste tuberculínico com valor de corte de 5 mm. TT (PPD10): teste tuberculínico com valor de corte de 10mm. IGRA: ensaio de liberação de interferon gama.

Quando avaliou-se o resultado dos exames (PPD5, PPD10) de acordo com o número de células T CD4+, utilizando o ponto de corte de 200 células/mm<sup>3</sup>, observou-se que a maioria, 60 (66,7%) pacientes com TB doença e infecção pelo HIV apresentava CD4 < 200 células/mm<sup>3</sup> e apenas 30 (33,3%) tinham CD4 ≥ 200 células/mm<sup>3</sup>. De acordo com o resultado dos testes observou-se que a maioria dos exames negativos ocorreram naqueles com CD4 < 200 células/mm<sup>3</sup>: 85,1%, TT(PPD5); 77,3%, TT(PPD10) e 93,5%, IGRA. Esses resultados foram estatisticamente significantes (p<0,001) (Tabela 21).

**Tabela 21. Distribuição das frequências e dos respectivos percentuais relativos ao resultado do teste tuberculínico (com ponto de corte acima de 5 mm e acima de 10 mm) e resultado do IGRA de acordo com a contagem de células T CD4+ ( $\geq 200$  ou  $< 200$  células/mm<sup>3</sup>) em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013**

Variável	Resultado	CD4 $\geq 200$		CD4 $< 200$		Total	P
		n	%	n	%		
TT (PPD5)	Negativo	10	14,9	57	85,1	67	<0,001
	Positivo	20	87	3	13	23	
	<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>33,3</b>	<b>60</b>	<b>67,7</b>	<b>90</b>	
TT(PPD10)	Negativo	17	22,7	58	77,3	75	<0,001
	Positivo	13	86,7	2	13,3	15	
	<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>33,3</b>	<b>60</b>	<b>67,7</b>	<b>90</b>	
IGRA	Negativo	2	6,5	29	93,5	31	<0,001
	Positivo	29	50	30	50	59	
	<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>34,4</b>	<b>59</b>	<b>65,6</b>	<b>90</b>	

TT (PPD5): teste tuberculínico com valor de corte de 5mm. TT (PPD10): teste tuberculínico com valor de corte de 10mm. IGRA: ensaio de liberação de interferon gama. n: frequência. %: percentual. p: significância ( $\chi^2$  de Pearson).

#### 4.2.5.2 Associação entre o TT e o IGRA

Na associação do TT e do IGRA, observa-se que 21 pacientes apresentaram TT e IGRA positivos e 29 pacientes apresentaram os dois testes negativos (Tabela 22).

**Tabela 22. Descrição das frequências relativas à associação do resultado do TT e do IGRA em 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença (grupo 2), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

		IGRA		Total
		Negativo	Positivo	
TT (PPD5)	Negativo	29	38	67
	Positivo	2	21	23
<b>Total</b>		<b>31</b>	<b>59</b>	<b>90</b>

IGRA: ensaio de liberação de interferon gama. TT: teste tuberculínico.

TT e IGRA (McNemar,  $p < 0,001$ ).

TT (PPD5) e IGRA (Kappa: 0,117, 90% IC: 0,015-0,218).

#### 4.2.5.3 Concordância do TT e do IGRA

Para avaliar se os resultados do IGRA e do TT concordaram, utilizou-se o teste de McNemar com o objetivo de verificar se as proporções de exames positivos (neste caso, sensibilidade) diferem para o TT e para o IGRA. Resultado indeterminado do IGRA foi tratado como positivo (apenas 3 pacientes). Para o teste tuberculínico, foram consideradas duas situações: TT positivo quando o tamanho da enduração medida em milímetros foi  $\geq 5$  (PPD5); e TT positivo quando o tamanho da enduração medida em milímetros foi  $\geq 10$  (PPD10).

Tanto para a variável PPD5 como para a variável PPD10, o teste de McNemar apresenta fortes evidências de que as sensibilidades entre o teste tuberculínico e o IGRA diferem (PPD5:  $p < 0,001$  e PPD10:  $p < 0,001$ ). Os valores Kappa e os intervalos de confiança indicaram uma fraca concordância entre o TT e o IGRA (PPD5/Kappa: 0,117, 90% IC: 0,015-0,218 e PPD10/Kappa: 0,228, 90% IC: 0,104–0,353).

#### 4.2.5.4 Pontos de corte dos valores de células T CD4+ visando à sensibilidade do TT e do IGRA

Para tornar o TT e o IGRA mais sensíveis na detecção da TB, buscou-se pontos de corte das células T CD4+ onde na presença de valores  $\geq$  ao ponto de corte encontrado o TT e o IGRA consigam diagnosticar a TB com maior sensibilidade. Foram consideradas as variáveis teste tuberculínico (PPD5, PPD10) e o IGRA. A sensibilidade do teste tuberculínico (PPD5) foi de 25,56% (95% IC: 16,94–35,84); a sensibilidade do teste tuberculínico (PPD10) foi de 16,67% (95% IC: 9,64 – 26,00) e a sensibilidade do IGRA foi de 65,56% (95% IC: 54,80 - 75,26) (Tabela 23).

**Tabela 23. Sensibilidade do teste tuberculínico (PPD5 e PPD10) e do IGRA em 90 pacientes coinfectados HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Variável	Sensibilidade	IC 95%
TT (PPD5)	25,56	16,94 – 35,84
TT (PPD10)	16,67	9,64 – 26,00
IGRA	65,56	54,80 – 75,26

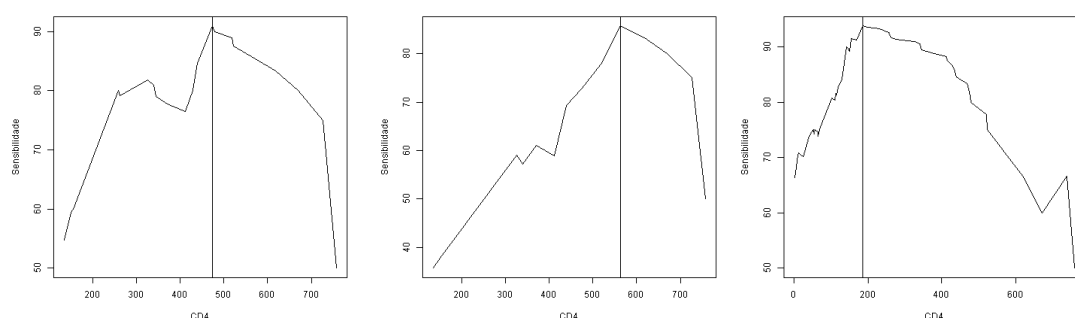
TT (PPD5): teste tuberculínico positivo com tamanho da enduração  $\geq 5$ mm. TT (PPD10): teste tuberculínico positivo com tamanho da enduração  $\geq 10$ mm. IGRA: ensaio de liberação de interferon gama.

Na Tabela 24 e Figura 7 observa-se que o ponto de corte de linfócitos T CD4 para o IGRA foi de 187 células/mm<sup>3</sup>, para o TT (PPD5) de 473 células/mm<sup>3</sup> e para o TT (PPD10) de 563 células/mm<sup>3</sup>.

**Tabela 24. Sensibilidade do teste tuberculínico (PPD5 e PPD10) e do IGRA, de acordo com o ponto de corte na variável CD4 em 90 pacientes coinfectados HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Variável	Ponto	Sensibilidade	IC 95%
TT (PPD5)	473	90,91	35,88 – 99,58
TT (PPD10)	563	85,71	42,13 – 99,54
IGRA	187	93,75	79,19 – 99,23

TT (PPD5): teste tuberculínico positivo com tamanho da enduração  $\geq 5$ mm. TT (PPD10): teste tuberculínico positivo com tamanho da enduração  $\geq 10$ mm. IGRA: ensaio de liberação de interferon gama. Ponto: ponto de corte de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>).



**Figura 7. Ponto de corte para a variável CD4, visando maximizar (probabilidade de 93,75) a positividade dos exames PPD5 (esquerda), PPD10 (centro) e IGRA (direita) em 90 pacientes coinfectados HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo. A linha vertical aponta o valor do CD4 a partir do qual o rendimento diagnóstico dos exames é maximizado.**

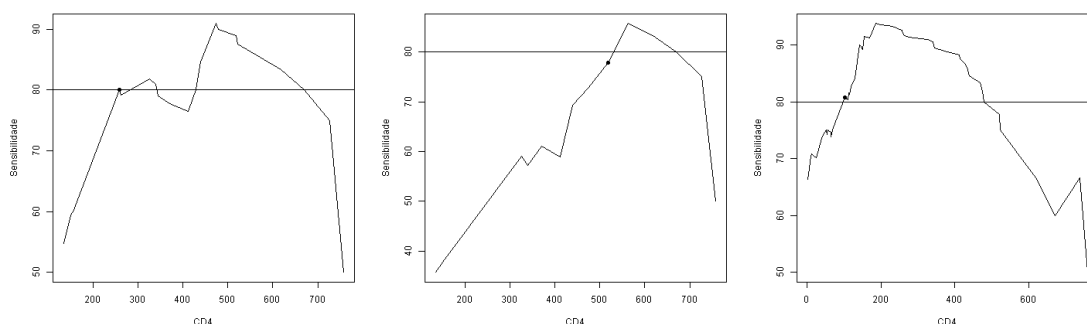


Análises semelhantes foram realizadas visando sensibilidade próxima a 80%, com pontos de corte para o número de linfócitos T CD4+ para TT (PPD5), TT (PPD10) e IGRA com valores de 259, 519 e 103 células/mm<sup>3</sup>, respectivamente (Tabela 25 e Figura 8).

**Tabela 25. Sensibilidade do teste tuberculínico (PPD5 e PPD10) e do IGRA, de acordo com o ponto de corte na variável CD4 em 90 pacientes coinfectados HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Variável	Ponto	Sensibilidade	IC 95%
TT (PPD5)	259	80,00	59,30 – 93,17
TT (PPD10)	519	77,78	39,99 – 97,19
IGRA	103	80,77	67,47 – 90,37

TT (PPD5): teste tuberculínico positivo com tamanho da enduração  $\geq 5\text{mm}$ . TT (PPD10): teste tuberculínico positivo com tamanho da enduração  $\geq 10\text{mm}$ . IGRA: ensaio de liberação de interferon gama. Ponto: ponto de corte de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>).



**Figura 8. Ponto de corte para a variável CD4, visando obter uma sensibilidade próxima de 80% para os exames PPD5 (esquerda), PPD10 (centro) e IGRA (direita). A linha horizontal mostra a região de sensibilidade de 80%, e o ponto preto revela a sensibilidade próximo ao menor ponto de corte de CD4 em 90 pacientes coinfectados HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo.**

#### 4.2.5.5 Relação entre a contagem de células T CD4+ e o resultado do TB Ag – Nil

Conceitos descritos no capítulo 3 (métodos) sobre o resultado do IGRA, são necessários para compreensão dos resultados descritos a seguir. Um dos critérios para o resultado do IGRA ser considerado positivo é TB Ag - NIL  $\geq 0,35\text{UI/ml}$ .

Na relação entre os valores de células T CD4 + e o resultado do TB Ag -Nil (IGRA) observou-se uma maior concentração de pontos para os menores valores das duas variáveis (Figura 9). Quando aplicado o teste de Spearman, o valor-p foi bastante significativo ( $p < 0,001$ ) mostrando que as duas variáveis em questão se relacionam, embora essa relação não seja muito forte (Spearman: 0,447) .

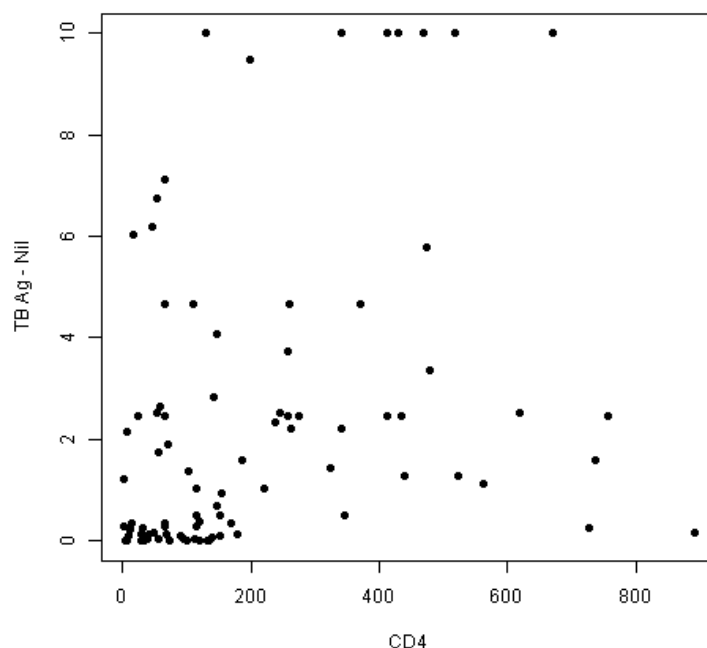


Figura 9. Gráfico de dispersão entre a contagem de células T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>) e o resultado do TB Ag – Nil (UI/ml) em 90 pacientes coinfectados HIV/TB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas três instituições do estudo (IIER, ISCMSP e ICF).

### 4.3 Análise dos resultados do grupo 3 composto por 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco de infecção latente pelo *M. tuberculosis* (ILTB)

#### 4.3.1 Análise descritiva

##### 4.3.1.1 Variáveis quantitativas

A média de idade dos indivíduos sem infecção foi de 44,56 ( $\pm 13,32$ ) anos, a média do tamanho da enduração do teste tuberculínico (TT) de 16,26 ( $\pm 5,24$ ) mm. (Tabela 26).

**Tabela 26. Descrição da média e desvio padrão relativos às variáveis quantitativas (idade tamanho da endureção do teste tuberculínico) em 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco de ILTB (grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Variável	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	N
<b>Idade</b>	44,56	13,32	18,00	69,00	90
<b>TT</b>	16,26	5,24	5,00	30,00	90

TT: teste tuberculínico.

#### 4.3.1.2 Variáveis qualitativas

Dos 90 pacientes entrevistados (risco de ILTB sem HIV), a maioria (67,78%) foi atendida no Instituto Clemente Ferreira, era do sexo feminino (61,11%), brancos (66,67%), vacinados com BCG (92,22%), com cicatriz vacinal (88,89%), e ninguém recebeu vacinação com o vírus vivo no último mês. Com relação ao risco de infecção pelo *M. tuberculosis*, a maioria (57,78%) dos pacientes teve risco baixo (Tabela 27).

**Tabela 27. Descrição das frequências e percentuais relativos à instituição a que os pacientes pertencem (ICF, IIER, ISCMSP), sexo, cor da pele, vacinação com BCG, cicatriz vacinal, vacinação com vírus vivo e risco de infecção pelo *M. tuberculosis* em 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco de ILTB, selecionados entre março/2012 e abril/2013**

Variável	Grupo	Frequência (n)	Percentual(%)
<b>Instituição</b>	ICF	61	67,78
	IIER	9	10,00
	ISCMSP	20	22,22
<b>Sexo</b>	Feminino	55	61,11
	Masculino	35	38,89
<b>Cor de pele</b>	Amarelo	3	3,33
	Branco	60	66,67
	Pardo	22	24,44
	Negro	5	5,56
<b>Vacinação com BCG</b>	Não	7	7,78
	Sim	83	92,22
<b>Cicatriz vacinal</b>	Não	10	11,11
	Sim	80	88,89
<b>Vacinação com vírus vivo</b>	Não	90	100,00
<b>Risco</b>	Alto	38	42,22
	Baixo	52	57,78

ICF: Instituto Clemente Ferreira. IIER: Instituto de Infectologia Emílio Ribas. ISCMSP: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

### 4.3.2 Teste tuberculínico (TT) e ensaio de liberação de Interferon gama (IGRA)

#### 4.3.2.1 Resultados do TT e do IGRA

Quanto aos exames realizados o teste tuberculínico foi positivo em 92,22% e o IGRA em 76,67% dos pacientes sem infecção pelo HIV com ILTB (Tabela 28).

**Tabela 28. Descrição das frequências e percentuais relativos ao resultado do teste tuberculínico (TT) e do IGRA em 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco de ILTB (grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Variável	Grupo	Frequência (n)	Percentual (%)
TT	Negativo	7	7,78
	Positivo	83	92,22
IGRA	Negativo	21	23,33
	Positivo	69	76,67

TT: teste tuberculínico. IGRA: ensaio de liberação de Interferon gama.

#### 4.3.2.2 Associação entre o TT e o IGRA

Na associação do TT e do IGRA, observou-se que 65 pacientes apresentaram TT e IGRA positivo e apenas três pacientes apresentaram os dois testes negativos (Tabela 29).

**Tabela 29. Descrição das frequências relativas à associação do resultado do TT e do IGRA nos 90 sem infecção pelo HIV com risco de ILTB (grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

		TT		Total
		Negativo	Positivo	
IGRA	Negativo	3	18	21
	Positivo	4	65	69
Total		7	83	90

TT: teste tuberculínico. IGRA: ensaio de liberação de interferon gama.

TT e IGRA (McNemar  $p=0,006$ ).

TT e IGRA (Kappa: 0,111, 90% IC: 0,000-0,253).

Para avaliar a associação entre TT e o IGRA, os testes de concordância de McNemar e Kappa foram utilizados. O teste de McNemar revelou fortes evidências estatísticas de que não há concordância entre o TT e o IGRA ( $p=0,006$ ). O valor Kappa revelou que não houve concordância entre os exames (Kappa: 0,111, 90% IC: 0,000-0,253).

Dos 90 indivíduos sem infecção pelo HIV com risco de ILTB, três pacientes apresentaram TT e IGRA negativos e 87 preencheram os critérios do estudo para o diagnóstico de ILTB (risco definido de ILTB e pelo menos um dos testes positivos, TT ou IGRA).

Nos 87 pacientes sem infecção pelo HIV com ILTB, observou-se que o TT foi positivo em 83 pacientes (95,40%) e negativo em quatro (4,60%) (Tabela 30). O IGRA foi positivo em 69 pacientes (79,31%) e negativo em 18 pacientes (20,69%) (Tabela 31).

Para avaliar o grau de concordância entre o resultado dos testes (TT e IGRA) e o diagnóstico de ILTB nos indivíduos sem infecção pelo HIV, utilizou-se o coeficiente de concordância Kappa. O TT demonstrou concordância moderada (Kappa: 0,580) e o IGRA, fraca concordância (Kappa: 0,214).

**Tabela 30. Descrição das frequências relativas ao resultado do TT de acordo com o diagnóstico de ILTB em 90 pacientes não infectados pelo HIV sob risco de ILTB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Variável	Grupo	ILTB		Total
		Ausente	Presente	
TT	Negativo	3	4	7
	Positivo	0	83	83
	Total	3	87	90

TT: teste tuberculínico. ILTB: Infecção latente pelo *M. tuberculosis*.  
TT e ILTB (Kappa: 0,580).

**Tabela 31. Descrição das frequências relativas ao resultado do IGRA de acordo com o diagnóstico de ILTB em 90 pacientes não infectados pelo HIV sob risco de ILTB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Variável	Grupo	ILTB		Total
		Ausente	Presente	
IGRA	Negativo	3	18	21
	Positivo	0	69	69
	Total	3	87	90

IGRA: ensaio de liberação de interferon gama. ILTB: Infecção latente pelo *M. tuberculosis*.  
IGRA e ILTB (Kappa: 0,214).

#### 4.3.2.3 Avaliação dos resultados do TT e do IGRA de acordo com o risco de infecção pelo *M. tuberculosis* (Risco)

Estudo do comportamento do TT e do IGRA, considerando como padrão-ouro o risco (alto ou baixo).

##### 4.3.2.3.1 TT e Risco

Nos pacientes sem infecção pelo HIV com risco de ILTB o teste tuberculínico foi positivo em 35 e negativo em três pacientes dos 38 com risco alto; e foi positivo em 48 e negativo em quatro pacientes de 52 com risco baixo (Tabela 32).

De acordo com as frequências observadas nas Tabelas 32 e 33 e para avaliar a possibilidade de associação do resultado do TT e do IGRA, de acordo com o risco nos pacientes do grupo 3 foi realizado o teste exato de Fisher. Não houve evidência estatística de associação entre o TT e o risco ( $p=1,000$ ), todavia quando avaliado o IGRA de acordo com o risco, observou-se fortes evidências da presença da associação ( $p<0,001$ ).

**Tabela 32.** Descrição das frequências relativas ao resultado do teste tuberculínico (positivo ou negativo), conforme o risco de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* nos pacientes sem infecção pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo

TT	Risco		Total
	Alto	Baixo	
<b>Positivo</b>	35	48	83
<b>Negativo</b>	3	4	7
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>52</b>	<b>90</b>

TT: teste tuberculínico.

TT e risco (Fisher  $p=1,000$ ).

TT e risco (Kappa: -0,002, 90% IC: 0,000-0,079).

#### 4.3.2.3.2 IGRA e Risco

Quando os pacientes foram avaliados, de acordo com o resultado do IGRA (positivo ou negativo) conforme o risco de infecção pelo *M. tuberculosis*, observou-se que a maioria dos pacientes com risco alto (38) apresentou IGRA positivo (37) (Tabela 33).

**Tabela 33.** Descrição das frequências relativas ao resultado do IGRA (positivo ou negativo), conforme o risco de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (alto ou baixo) em 90 pacientes sem infecção pelo HIV com ILTB (Grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo

IGRA	Risco		Total
	Alto	Baixo	
<b>Positivo</b>	37	32	69
<b>Negativo</b>	1	20	21
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>52</b>	<b>90</b>

IGRA: ensaio de liberação de interferon gama.

IGRA e risco (Fisher  $p<0,001$ ).

IGRA e risco (Kappa: 0,323, 90% IC: 0,189-0,457).

#### 4.3.2.3.3 Associação do TT e do IGRA de acordo com o Risco

Na associação do TT e do IGRA de acordo com risco, observou-se que 30 pacientes com risco baixo apresentaram TT e IGRA positivos e 35 pacientes com risco alto apresentaram os dois testes positivos (Tabela 34 e 35).

**Tabela 34. Descrição das frequências relativas aos resultados do teste tuberculínico (TT) e do IGRA nos 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco baixo de ILTB (Grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Risco			TT		Total
			Negativo	Positivo	
Baixo	IGRA	Negativo	2	18	20
		Positivo	2	30	32
		Total	4	48	52

TT: teste tuberculínico. IGRA: ensaio de liberação de interferon gama.

**Tabela 35. Descrição das frequências relativas aos resultados do teste tuberculínico (TT) e do IGRA nos 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco alto de ILTB (Grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Risco			TT		Total
			Negativo	Positivo	
Alto	IGRA	Negativo	1	0	1
		Positivo	2	35	37
		Total	3	35	38

TT: teste tuberculínico. IGRA: ensaio de liberação de interferon gama.

#### 4.3.2.3.4 Concordância do TT e do IGRA de acordo com o Risco

Para avaliar a concordância entre o resultado do TT e o IGRA (positivo ou negativo) e o risco (alto ou baixo), os testes de McNemar e Kappa foram utilizados.

Não houve evidência estatística para rejeitar a hipótese de concordância entre cada exame e o risco de infecção pela *Mycobacterium tuberculosis*, o teste de McNemar não rejeitou a hipótese de que a sensibilidade e o valor preditivo positivo do TT ( $p < 0,001$ ) e do IGRA ( $< 0,001$ ) sejam iguais.



O valor Kappa para o teste tuberculínico e o risco foi negativo (Kappa:-0,002, 90% IC: 0,000-0,079), revelando que a concordância entre as duas variáveis é mais fraca do que se esperaria da distribuição dos dados ao acaso. Observou-se fraca concordância entre o IGRA e o risco, pelo intervalo de confiança, que admite valores acima de 0,40, a concordância entre essas variáveis está entre fraca e razoável (Kappa: 0,323, 90% IC: 0,189-0,457).

#### **4.3.2.3.5 Sensibilidade (Se), Especificidade (Es), Valor Preditivo positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN) do TT e do IGRA de acordo com o Risco**

Na Tabela 32 e Tabela 33, foram estimadas as medidas de sensibilidade (Se), especificidade (Es), valor preditivo positivo (VPP) e valor de preditivo negativo (VPN) para o TT e o IGRA, considerando o risco como padrão-ouro. As estimativas e os intervalos de confiança, para essas medidas são apresentados na Tabela 36.

Considerando-se o TT de acordo com o risco de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* nos pacientes sem infecção pelo HIV com ILTB a sensibilidade do exame foi de 92,11% (95% IC: 78,62 - 98,34), a especificidade de 7,69% (95% IC: 2,14 - 18,54), o VPP de 42,17% (95% IC: 31,40 - 53,51) e o VPN de 57,14% (95% IC: 18,41 - 90,10). Assim, o TT foi capaz de detectar ILTB em 92,11% das vezes, detectar que o paciente não está com ILTB em apenas 7,69% das vezes, a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com prognóstico positivo para infecção latente pelo *M. tuberculosis* foi de 42,17% e a proporção de verdadeiros negativos foi de 57,14%. Em relação ao IGRA, de acordo com o risco nos pacientes sem infecção pelo HIV com ILTB, a sensibilidade foi de 97,37% (95% IC: 86,19 - 99,93), especificidade de 38,46% (95% IC: 25,30- 52,98), VPP de 53,62% (95% IC: 41,20- 65,72) e VPN de 95,24 (95% IC: 76,18- 99,88). Desta forma, o IGRA foi capaz de detectar ILTB em 97,37% das vezes, detectar que o paciente não está com ILTB em apenas 38,46% das vezes, aqueles com IGRA positivo têm 53,62% de chance de ter infecção latente pelo *M. Tuberculosis* (VPP) e aqueles com IGRA negativo têm 95,24 % de chance de não apresentar ILTB (VPN) (Tabela 36).

**Tabela 36. Estimativas e intervalos de confiança, nível de 95%, para as medias de sensibilidade (Se), especificidade (Es), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do TT e IGRA, utilizando o risco como padrão-ouro nos 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 3), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Exame	Medida	Estimativa	IC 95%
TT	Se	92,11	76,62 – 98,34
	Es	7,69	2,14 – 18,54
	VPP	42,17	31,40 – 53,51
	VPN	57,14	18,41 – 90,10
IGRA	Se	97,37	86,19 – 99,93
	Es	38,46	25,30 – 52,98
	VPP	53,62	41,20 – 65,72
	VPN	95,24	76,18 – 99,98

TT: teste tuberculínico. IGRA: ensaio de liberação de interferon gama.

Quanto ao tratamento da infecção latente pelo *M. tuberculosis*, após a realização do estudo 57,78% dos pacientes receberam tratamento para ILTB com isoniazida (Tabela 37).

**Tabela 37. Descrição das frequências e respectivos percentuais relativos ao tratamento da ILTB atual e fármaco utilizado em 90 pacientes não infectados pelo HIV com risco de ILTB, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo**

Variável	Grupo	Frequência (n)	Percentual(%)
Tratamento ILTB Atual	Não	38	42,22
	Sim	52	57,78
Fármaco utilizado	Isoniazida	52	100,00

Tto.ILTB atual: tratamento da infecção latente pelo *M. tuberculosis* atual.

#### 4.4 Comparação dos resultados do grupo 1 (HIV/ILTB) e grupo 2 (HIV/TB-doença)

O objetivo é comparar pacientes infectados pelo HIV/AIDS, com risco de infecção latente pelo *M. tuberculosis* (grupo 1) e com tuberculose doença (grupo 2).

#### 4.4.1 Análise descritiva

##### 4.4.1.1 Variáveis quantitativas

Os pacientes do grupo 2 em comparação com os pacientes do grupo 1 apresentaram as menores médias relacionadas a contagem de células T CD4+(CD4) e contagem de células T CD8+ (CD8), 198,92 ( $\pm 206,21$ ), 529,58 ( $\pm 321,91$ ), respectivamente. A média da carga viral do HIV do grupo 2 foi bem superior à do grupo 1 (Tabela 38, Figuras 10, 11 e 12).

**Tabela 38. Descrição das médias, desvio-padrões, valores mínimos e máximos da contagem de células T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>), contagem de células T CD8+(células/mm<sup>3</sup>), carga viral do HIV(cópias/ml) e log de carga viral do HIV em 90 pacientes infectados pelo HIV com risco de ILTB e 90 pacientes infectados pelo HIV com TB doença, selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas três instituições do estudo**

Variável	Estatística	Grupo 1	Grupo 2
CD4	Média	557,51	198,92
	Desvio padrão	283,89	206,21
	Mínimo	114,00	2,00
	Máximo	1259,00	891,00
CD8	Média	835,41	529,58
	Desvio padrão	331,79	321,91
	Mínimo	225,00	63,00
	Máximo	2112,00	1645,00
Carga Viral	Média	514,69	104.712,97
	Desvio padrão	1814,02	164.230,65
	Mínimo	50,00	50,00
	Máximo	10.023,00	500.000,00
log <sup>10</sup> (CV)	Média	1,89	3,63
	Desvio padrão	0,55	1,57
	Mínimo	1,70	1,70
	Máximo	4,00	5,70

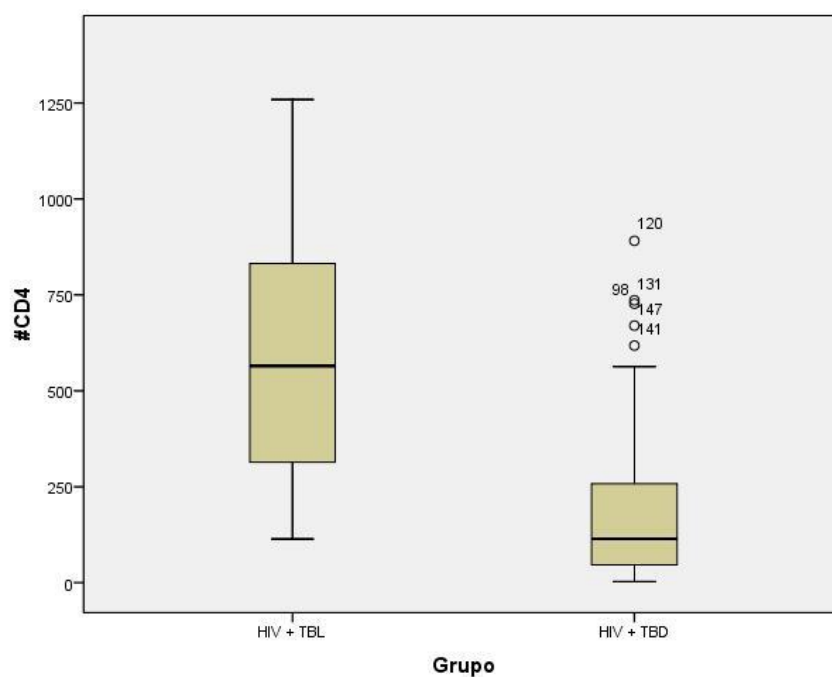


Figura 10. Diagrama de caixas (Boxplot) dos valores de células T CD4+ dos pacientes de acordo com os grupos: risco de ILTB com infecção pelo HIV (Grupo 1) e coinfeção HIV/TB (grupo 2).

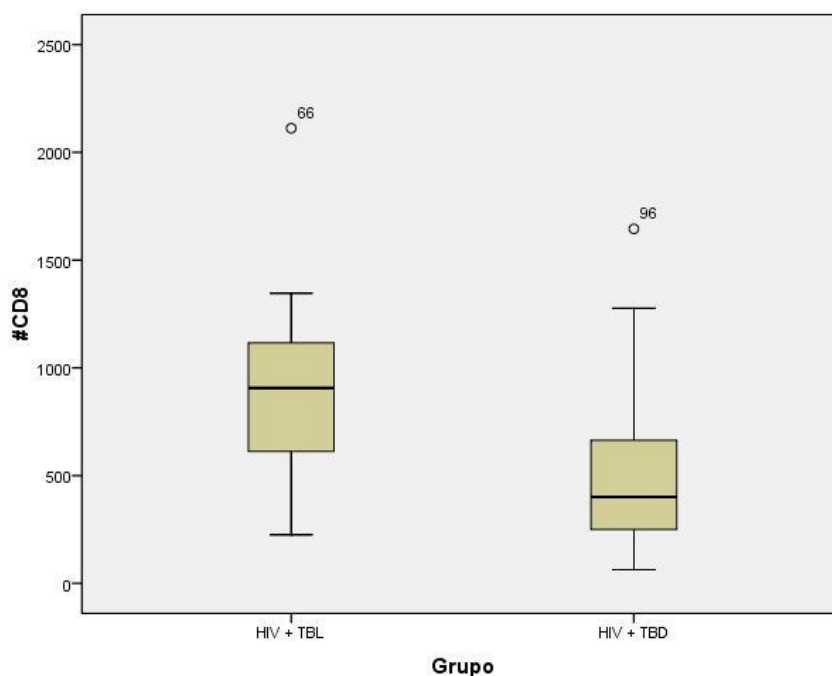
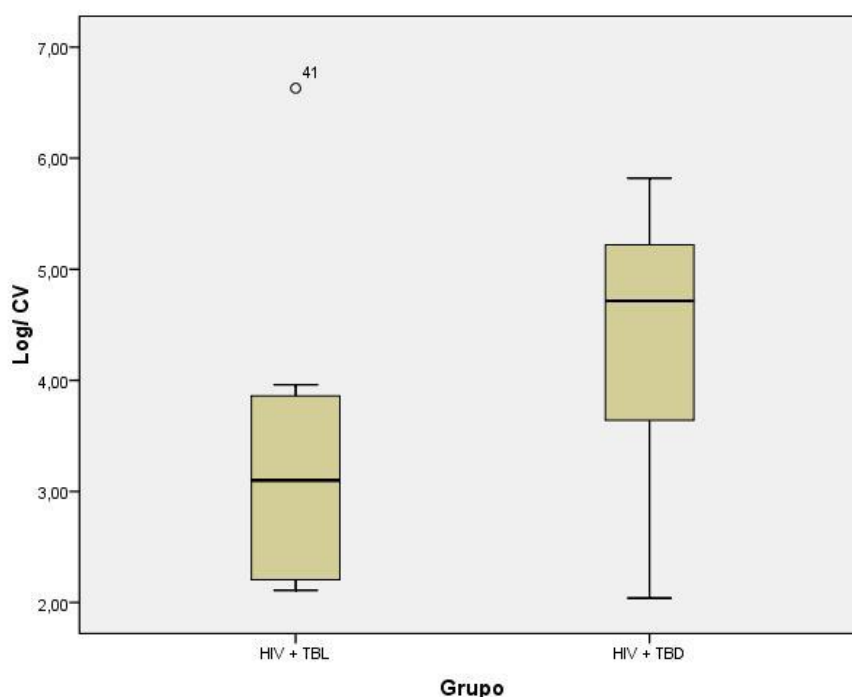


Figura 11. Diagrama de caixas (Boxplot) dos valores de células T CD8+ dos pacientes de acordo com os grupos: risco de ILTB com infecção pelo HIV (grupo 1) e coinfeção HIV/TB (Grupo 2).



**Figura 12.** Diagrama de caixas (Boxplot) do  $\log^{10}$  da carga viral do HIV dos pacientes de acordo com os grupos: risco de ILTB com infecção pelo HIV (Grupo 1) e coinfeção HIV/TB (grupo 2).

Quando os pacientes do grupo 1 e 2 foram distribuídos de acordo com a classificação do CDC (categorização de HIV/AIDS baseada na menor quantificação das células T CD4+ documentada e na presença de condições relacionadas ao HIV previamente diagnosticadas. Indivíduos classificados nas categorias A3, B3, C1, C2 e C3 são considerados como AIDS) (Ministério da Saúde, 2004), observou-se que os pacientes do grupo 1, a maioria (48 pacientes) era assintomático e com contagem de células T CD4 +  $\geq 500$  células/mm<sup>3</sup> (Classificação A1), enquanto que 60 pacientes do grupo 2 eram sintomáticos com contagem de células T CD4 +  $< 200$  células/mm<sup>3</sup> (Classificação C3) (Quadro 2).

**Quadro 2. Distribuição de 90 pacientes com HIV/risco de ILTB (grupo 1) e 90 coinfectados HIV/TB-doença (Grupo 2), selecionados entre março/2012 e abril/2013 nas instituições do estudo, de acordo com a classificação do CDC/1992, adaptada pelo Ministério da Saúde em 2004**

<b>CLÍNICA T CD4+ células/mm<sup>3</sup></b>	<b>A Assintomático ou infecção aguda pelo HIV ou LGP</b>	<b>B Condições sintomáticas não A não C</b>	<b>C Condições indicativas de AIDS</b>
≥ 500	A1 GRUPO 1 (48) GRUPO 2 (5)	B1 GRUPO 2 (1)	C1 GRUPO 2 (2)
200 – 499	A2 GRUPO 1 (16) GRUPO 2 (16)	B2 GRUPO 1 (10) GRUPO 2 (4)	C2 GRUPO 1 (7) GRUPO 2 (2)
< 200	A3	B3	C3 GRUPO 1(9) GRUPO 2 (60)

A = pacientes assintomáticos ou infecção aguda pelo HIV ou LGP (linfadenopatia generalizada persistente).

B = sintomáticos não A não C.

C = condições indicativas de AIDS.

Quanto ao uso de terapia antirretroviral (TARV), o maior percentual foi no grupo 1 (93,33%) em comparação ao grupo 2 em que apenas 63,33% usava TARV, apesar da baixa contagem de células T CD4+ nesse grupo, média de 198,92 ( $\pm 206,21$ ) células/mm<sup>3</sup>.

## 5. DISCUSSÃO

---

Para o diagnóstico correto da ILTB, deve-se considerar sempre o risco de infecção pelo *M. tuberculosis*, para tal, os estudos com o IGRA vêm ganhando grande espaço na literatura, como se observa em artigo que revisou 637 estudos relacionados ao diagnóstico da TB, em que as pesquisas com interferon gama (IFN- $\gamma$ ) ocorreram em 262 artigos (41%), publicados de janeiro de 2008 a dezembro de 2011 (McNerney et al., 2012). Outro ponto é a disponibilidade de novos métodos diagnósticos nas unidades básicas de saúde, geralmente aonde os pacientes com TB ou ILTB e HIV são atendidos, os novos testes estão disponíveis apenas nos centros de referência terciária (Cobelens et al., 2012). O desafio para um novo método diagnóstico é reunir boa sensibilidade e especificidade (acurácia), evitar falso-positivos, ser de fácil aplicação, baixo custo, rápida realização e incorporado ao arsenal de testes diagnósticos disponíveis (Moulton et al., 2007; Rusen et al., 2010; Squire et al., 2011; Vassall et al., 2011; Cobelens et al., 2012). Os ensaios de liberação de interferon gama (IGRA), apesar do grande número de publicações, ainda não tem seu papel bem definido em pacientes infectados pelo HIV/AIDS, motivo dessa pesquisa.

### 5.1 Grupo 1 (Infectados pelo HIV com ILTB)

No presente estudo a análise dos dados demográficos do grupo 1, composto por 90 indivíduos infectados pelo HIV com risco de infecção latente pelo *M. tuberculosis*, revelou que houve predomínio discreto dos casos no sexo masculino (56,67%), a média de idade da população foi inferior a quarenta anos (39,28) e em relação à cor da pele houve predomínio de brancos (57,78%) (Tabela 1 e Tabela 2). Esses dados traduzem as mudanças que acompanham a população infectada pelo HIV no país ao longo dos anos.

No início da epidemia, a infecção pelo HIV predominava claramente no sexo masculino, nas últimas décadas assistimos à feminização do HIV. Neste estudo a relação entre homens e mulheres foi de 1,3:1, pouco inferior à observada em estudo realizado no IIER com coinfectados, de 1,4:1 (Klautau, Kuschnaroff, 2005). Esse aumento de casos no sexo feminino deve ser motivo de preocupação, exigindo investimentos em medidas educativas pertinentes e eficazes, que vislumbrem



também a redução da transmissão materno-infantil do HIV. O programa atual do Ministério da Saúde prioriza essa prática (Ministério da Saúde, 2010, 2011).

A média de idade deste estudo foi de 39,28 anos e assemelha-se à de 37 anos encontrada em trabalho nacional, realizado por Carvalho et al. (2002) e em estudo que avaliou casos de TB isoladamente (Gomes et al., 2003). Em estudo europeu, Girardi et al. (2000) encontraram média de idade de 34,3 anos, semelhante ao estudo realizado no IIER com coinfectados (HIV/TB), com predomínio dos casos em indivíduos de 30 a 39 anos (39,7%) (Klautau, Kuschneroff, 2005); outros estudos mais antigos confirmam a prevalência da coinfeção nessa faixa etária (Kerr-Pontes et al., 1997; Costa, 2003) e em adultos jovens (Santoro-Lopes et al., 2002; Rodrigues et al., 2003), assim como, estudos recentes sobre a distribuição dos casos notificados de AIDS, tanto no município de São Paulo como no Brasil (Ministério da Saúde, 2011).

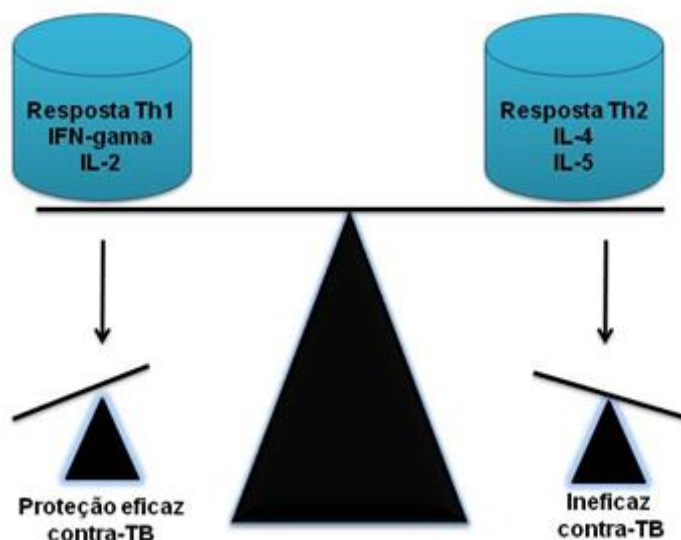
Em relação à cor da pele, houve predomínio de brancos (57,78%), todavia uma percentagem menor em relação a estudos realizados na década passada, com predomínio maior de brancos nos pacientes matriculados no CRT-DST/AIDS, entre 1980 e 2001, dos quais 83,5% eram brancos (Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac", 2003). Na verdade acreditamos que apesar das dificuldades metodológicas inerentes à classificação da cor da pele visando à classificação racial dos indivíduos (Pinto et al., 1996) e da questão levantada por Bamshad, Olson (2004) de que o fato de se pertencer a um ou outro grupo étnico deve desempenhar papel diminuto nos estudos médicos, optou-se por incluir esse quesito neste estudo pela possibilidade de maior vulnerabilidade de determinados grupos étnicos aos problemas de saúde especialmente a tuberculose e às DST/AIDS (Ministério da Saúde, 2013; World Health Organization, 2013).

Neste estudo, observamos que a maioria dos pacientes do grupo 1 apresentou valores altos de linfócitos T CD4+ (maior que 500 células/mm<sup>3</sup>) (Tabela 1), com bom controle imunológico e virológico da doença (AIDS), momento ideal para o diagnóstico e tratamento da ILTB (Akolo et al., 2010).

É bem conhecido que o linfócito T CD4+ é a mais importante célula efetora na imunidade mediada por células na tuberculose (Westby et al., 1996; Hogan, Hammer, 2001). Na resposta imune ao *M. tuberculosis*, a resposta Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2)

tem grande importância, pois, estimula a formação e organização dos granulomas pelos macrófagos (Clerici, Shearer, 1993; Clerici et al., 1996) (Figura 13).

Explica-se, desse modo, a maior probabilidade da ocorrência de TB em indivíduos infectados pelo HIV e o fato de que nessa população, o principal mecanismo de patogênese da TB é a reativação de doença latente e, assim, a importância do diagnóstico precoce e do tratamento da infecção latente pelo *M. tuberculosis* (ILTb), fundamentais nos pacientes com AIDS (Conde et al., 2009; World Health Organization, 2009; Ministério da Saúde, 2011; World Health Organization, 2013; Zumla et al., 2013).



**Figura 13. Equilíbrio da resposta Th1 e Th2**

Em relação à terapia antirretroviral a maioria dos pacientes do grupo 1 recebia TARV (93,33%). Vários estudos demonstraram que a TARV pode evitar a evolução para a AIDS e diminuir a ocorrência de tuberculose, a introdução da TARV isoladamente, tem grande impacto na redução dos casos de TB, todavia, a incidência da doença permanece inaceitavelmente alta, e muitos pacientes apresentam TB antes da indicação de TARV (Girardi et al., 2000; Badri et al., 2002a, 2002b; Santoro-Lopes et al., 2002; Horsburgh, 2004; Lawn et al., 2005a, 2005b; Ministério da Saúde, 2008b, 2008a; Kaplan et al., 2009; Ministério da Saúde, 2013).

As pesquisas mostram o impacto da TARV na redução do risco de TB, especialmente em regiões de alta endemicidade. Metanálise recente, que incluiu onze estudos, demonstrou que o início do tratamento antirretroviral é associado à redução da incidência da TB em infectados pelo HIV, com diferentes estádios de imunodeficiência (células T CD4+/mm<sup>3</sup> menor que 200, entre 200 e 350 e maior que 350), principalmente se associado ao tratamento da infecção latente com isoniazida (Suthar et al., 2012).

Sabemos que o diagnóstico da infecção latente pelo *M. tuberculosis* e seu tratamento são medidas de grande importância nos pacientes com AIDS (Corbett et al., 2003; Horsburgh, 2004; Redelman-Sidi, Sepkowitz, 2013), assim, a procura e análise correta da população sob risco de infecção pelo *M. tuberculosis* é fundamental e foi preocupação desse estudo, desta forma, a classificação do risco em alto e baixo foi feita com base nos critérios clínicos, epidemiológicos e considerando a definição de contato de Rose. Utilizou-se um sistema de pontuação para facilitar a definição do risco. O objetivo de classificar os indivíduos de acordo com o risco alto ou baixo se justifica pela fragilidade do teste tuberculínico como ferramenta utilizada como padrão-ouro para o diagnóstico da infecção latente pelo *M. tuberculosis* sem, contudo, deixarmos de reconhecer a importância do TT nos países de alta prevalência da TB. A falta de um padrão-ouro adequado para o diagnóstico da ILTB, e pelas dificuldades na interpretação do TT, principalmente em pacientes imunodeprimidos, contribuíram para a decisão de considerar o risco como padrão-ouro. Assim o estudo foi feito nos indivíduos sob risco de ILTB.

Nesse grupo de pacientes infectados pelo HIV, observamos que a maioria apresentou risco alto de infecção pelo bacilo (76,67%) (Tabela 2).

Com relação aos resultados dos testes TT e IGRA, observou-se que não houve concordância entre os exames, com valor Kappa revelando fraca concordância (Kappa: 0,271). O ponto de maior discordância foi com o TT negativo e IGRA positivo (Tabela 4). As possibilidades para a discordância observada são que nos infectados pelo HIV, frente à imunodepressão, pode ocorrer resultado falso negativo do TT, nessa situação o IGRA teria maior sensibilidade. Aplicado o teste de Mann-Whitney ( $p < 0,001$ ) os valores mais baixos de células T CD4+ ocorreram quando o TT era negativo e o IGRA positivo (Figura 3). Apesar do IGRA sofrer

influência da contagem de células T CD4+, este teste é capaz de detectar a ILTB com maior confiabilidade nesta população do que o TT (Rangaka et al., 2007; Kabeer et al., 2010; Cattamanchi et al., 2011; Sester et al., 2011; Chee et al., 2013).

Outra possibilidade para a discordância é que os contatos recentes de bacilíferos, podem apresentar TT negativo nas primeiras 2 a 8 semanas após a infecção pelo *M. tuberculosis* (fenômeno de hipersensibilidade tardia), por outro lado, acredita-se que a conversão do IGRa ocorra precocemente após a infecção (Aichelburg et al., 2014).

Estudo em pacientes com AIDS que avaliou a reversão e conversão do IGRa em país de baixa incidência de tuberculose (Áustria), avaliados no início do estudo e 24 meses após, observou resultados concordantes em 86%, conversão em 9% e reversão em 33%. Apesar de ainda não estar muito bem estabelecido o significado da conversão e reversão do IGRa, parece de grande valor repetir o IGRa nos pacientes com AIDS (Aichelburg et al., 2014). Já a repetição do TT pode sofrer sensibilização com variação nos resultados o que não ocorre com o IGRa (Mazurek et al., 2010).

Como estabelecido na metodologia, o diagnóstico da ILTB ocorreu naqueles indivíduos sob risco de ILTB com pelo menos um dos testes positivos (TT ou IGRa). Dos 90 infectados pelo HIV sob risco de ILTB, 80 pacientes preencheram os critérios do estudo para o diagnóstico de ILTB (Tabela 4). Ao avaliar a concordância dos testes com o diagnóstico de ILTB, o TT demonstrou fraca concordância (Kappa: 0,384) e o IGRa boa concordância (Kappa: 0,769).

Apenas 10 pacientes com TT e IGRa negativos, não tiveram o diagnóstico de ILTB. A questão é se esses estamos diante de resultados falso-negativos, ou se realmente esses indivíduos não se infectaram pelo bacilo. Portanto, as características desse grupo devem ser avaliadas. A média de idade foi de 41 anos; a média do tempo de exposição à bacilíferos foi de 1,7 meses; a média dos valores de células T CD4+ foi de 415 células/mm<sup>3</sup>. Todos os pacientes recebiam TARV e apresentavam carga viral indetectável. Assim, acreditamos que esses indivíduos com bom controle imunológico e virológico, realmente não se infectaram pelo *M. tuberculosis*.

Quando avaliados de acordo com o risco, não observou-se evidências de associação entre o TT e o risco, mas fortes evidências de associação do IGRA com o risco de ILTB. Esses dados foram corroborados pelo coeficiente de concordância Kappa, com boa concordância entre o IGRA e o risco (Kappa: 0,724) e ausência de concordância entre o TT e o risco (Kappa: 0,147). Desta forma, nesta população infectada pelo HIV, o IGRA foi expressivamente mais associado ao risco de infecção pelo *M. tuberculosis* do que o TT.

Em relação à sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de acordo com risco, o IGRA apresentou melhores resultados que o TT, todavia, a especificidade do IGRA (66,67%) apesar de melhor que a do TT (47,62%) (Tabela 11) foi abaixo da encontrada em outros estudos (> 90%) (Cattamanchi et al., 2011; Fujita et al., 2011; Sester et al., 2011; Chee et al., 2013). Assim, frente a esses resultados acreditamos que o IGRA é melhor que o TT como teste de triagem para indivíduos infectados pelo HIV com risco de ILTB.

Quanto ao tratamento da ILTB após a realização dos exames do estudo 74,44% dos pacientes receberam tratamento, na maioria das vezes (95,71%) o fármaco utilizado foi a isoniazida por 6 meses, apenas 3 pacientes receberam rifampicina por 4 meses, por intolerância ou contra-indicações à isoniazida (Tabela 12). Considerando-se o diagnóstico de ILTB em 88,88% daqueles sob risco de ILTB, 14,44% dos pacientes, apesar de indicado, não receberam o tratamento.

No Brasil, as indicações para tratamento da ILTB em pacientes infectados HIV são: aqueles com radiografia de tórax normal e TT  $\geq$  5mm; contatos intradomiciliares ou institucionais de pacientes bacilíferos, independentemente do resultado do TT; TT < 5mm com história de TT  $\geq$  5mm no passado, sem tratamento para ILTB; radiografia de tórax com cicatriz radiológica de TB, sem tratamento anterior para TB (afastada a possibilidade de TB doença), independentemente do resultado do TT (Ministério da Saúde, 2011).

De acordo com guideline do NICE (*National Institute for Health and Clinical Excellence*), o tratamento da ILTB deve ser considerado nas seguintes situações, após afastada TB doença: indivíduos com 35 anos ou mais jovens, devido ao aumento do risco de hepatotoxicidade com o envelhecimento; pacientes infectados pelo HIV de qualquer idade; profissionais de saúde; indivíduos não vacinados com o

BCG com TT positivo (6 mm ou mais), ou naqueles vacinados com o BCG com IGRA positivo e TT positivo (15 mm ou mais) (National Institute for Health and Clinical Excellence, 2011). A abordagem da ILTB da OMS recomenda que os programas de controle de tuberculose priorizem o tratamento para ILTB em indivíduos infectados pelo HIV com TT  $\geq 5$  mm e em indivíduos assintomáticos recentemente infectados (conversão tuberculínica). Com relação aos contatos, apenas lactentes e crianças teriam prioridade (World Health Organization, 2008). A recomendação da OMS tem como principal alvo os países com elevada prevalência de TB. Segundo a OMS, em 2010, 2,3 milhões de indivíduos infectados pelo HIV foram avaliados para a TB, e 178.000 entre aqueles com ILTB iniciaram o tratamento (o dobro de 2009), mas os esforços devem ser intensificados para atingir os objetivos do plano global de fornecer investigação de TB para todos os pacientes infectados pelo HIV, e a administração de tratamento para a ILTB para todos os elegíveis até 2015 (World Health Organization, 2011a).

No consenso redigido pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), pela *American Thoracic Society* (ATS) e pela *Infectious Disease Society of America* (IDSA) recomenda-se que o tratamento para a infecção latente pelo *M. tuberculosis* seja oferecido a todas as pessoas infectadas que sejam consideradas de alto risco para desenvolver a tuberculose, independentemente da idade e da presença de infecção pelo HIV. Assim, além de portadores de HIV, indivíduos sem infecção pelo HIV, como crianças, imigrantes, moradores de rua, prisioneiros e contatos de pacientes com TB doença (independentemente de terem baciloscopia direta de escarro positiva ou não), mesmo adultos, teriam indicação de tratamento da ILTB (American Thoracic Society, 2000, 2005). O CDC define como contato próximo a história de contato por mais de quatro horas no mesmo espaço físico durante, pelo menos, uma semana. Entre contatos, o TT é considerado positivo se a enduração cutânea for  $\geq 5$  mm. Revisão sistemática, observou que, na investigação de contatos de casos índice de TB pulmonar, 4,5% apresentavam TB, e 51,4% apresentavam ILTB, sugerindo que essa estratégia deve ser fortemente recomendada para melhorar a detecção de casos e diminuir a transmissão do *M. tuberculosis* (American Thoracic Society, 2000, 2005).

## 5.2 Grupo 2 (infectados pelo HIV com TB doença)

A análise do grupo 2, composto por pacientes infectados pelo HIV com TB doença, revelou que a maioria da população do estudo era composta por homens, brancos, 39 anos, pertenciam ao IIER e apresentavam imunossupressão grave (média de linfócitos T CD4<200 células/mm<sup>3</sup>) (Tabela 11 e 12). Quanto à apresentação clínica da TB observou-se que os sinais e sintomas clássicos da TB foram frequentes nos pacientes infectados pelo HIV, portanto, devem ser sempre valorizados nessa população (Tabela 17) (Getahun et al., 2011; Bates et al., 2012).

Quanto ao risco essa avaliação não se aplica no grupo 2, neste grupo de coinfectados (HIV/TB doença), a TB ocorre comumente por reativação da infecção latente. Nos indivíduos imunocomprometidos, a forma mais comum de apresentação da TB é a chamada infecção pós-primária que ocorre por reativação de focos primários, podendo também ocorrer por inalação de novos bacilos. Mais raramente, por meio de infecção primária, adquirida pela via respiratória através do contato com indivíduos portadores da forma pulmonar da TB (Pape et al., 1983; Selwyn et al., 1989; Daley et al., 1992; Melo, Afiune, 1993; Alpert et al., 1997; Rosemberg et al., 1999).

As formas pulmonares da TB foram as mais frequentes (45,56%), todavia a ocorrência de formas extrapulmonares (25,56%) e disseminadas (21,11%) (Tabela 15) foi superior à observada em indivíduos não infectados pelo HIV relatados na literatura (Mtei et al., 2005; Cain et al., 2010; Lawn, Zumla, 2011; von Reyn et al., 2011; Mudenda et al., 2012), pois, a população estudada é composta na maioria por pacientes com importante comprometimento imunológico, população esta em que as formas extrapulmonares e disseminadas ocorrem com maior frequência (Klautau, Kuschnaroff, 2005; Caws et al., 2008).

Conforme observado na Tabela 16 e Figura 6, o comprometimento ganglionar (linfonodal) isolado correspondeu à maioria dos casos da forma extrapulmonar (69,57%).

No período anterior à pandemia pelo HIV, aproximadamente 85% dos casos de tuberculose eram limitados ao pulmão e os 15% restantes apresentavam envolvimento extrapulmonar (Farer et al., 1979). Entretanto, essa distribuição

modificou-se nos indivíduos coinfectados (Silva, 1993). Em trabalho realizado no Complexo Hospitalar do Mandaqui (São Paulo), Melo et al. (1990) observaram comprometimento extrapulmonar em 37,5% dos casos. Em estudo realizado em Nova Iorque (EUA) observou-se que o envolvimento pulmonar ocorreu em 43,5% dos casos, o acometimento extrapulmonar em 21,5% e a associação da forma pulmonar e a extrapulmonar em 34,8% (Alpert et al., 1997). Estudo brasileiro, retrospectivo, observou 40% de casos com envolvimento pulmonar, 11% extrapulmonar e 49% com associação das duas formas (Atomiya et al., 2002). Comprometimento ganglionar em 36,7% dos casos e 30,5% de forma disseminada da doença foi demonstrado em estudo de Song et al. (2003).

A forma disseminada já bem conhecida em pacientes com imunossupressão avançada, chamada de forma não-reativa da doença foi observada em mais de 20% neste estudo (Juhl, 1993; Miller, Miller, 1993; McAdams et al., 1995; Kritski et al., 2000). Portanto, as formas extrapulmonares ocorrem com maior frequência nos pacientes com AIDS e a forma disseminada naqueles mais imunodeprimidos.

Nesse estudo, a seleção dos casos foi feita no momento da confirmação do diagnóstico da TB e a maioria foi selecionada (67%) durante internação hospitalar e estavam em estágio avançado de imunossupressão (AIDS C3-CDC), neste caso seria mais adequado a inclusão de pacientes em diferentes estágios de imunodeficiência, alguns ainda não preenchendo critérios para a definição de AIDS e outros com doença grave.

Quanto ao método utilizado para o diagnóstico da TB, a cultura isoladamente ou em associação foi o método diagnóstico mais utilizado (84,45%) (Tabela 18). O escarro foi o local em que mais foi isolado o agente (53,33%) (Tabela 19).

A hipervalorização do estudo bacteriológico, baseada na política da OMS de incentivo à identificação de casos novos de TB, por meio do exame de escarro em sintomáticos respiratórios, é importante frente a multirresistência aos fármacos. Contudo, a posição de deixar em segundo plano a suspeita diagnóstica com base na radiologia merece revisão, segundo alguns autores, diante da nova realidade trazida pelo HIV (Afiune, Ide Neto, 1993) e considerando a riqueza de achados nos pacientes imunodeprimidos. Portanto, acreditamos que os métodos (isolamento do agente, radiologia e exame anatomopatológico) são importantes e complementares,



ressaltando-se que, em fases avançadas da infecção pelo HIV, diante do grande número de diagnósticos diferenciais, a procura do agente etiológico deve ser exaustiva.

Quanto ao uso de antirretrovirais neste grupo, apenas 63,33% dos coinfectados usava, considerando-se que a média da contagem de células T CD4+ era menor que 200 células/mm<sup>3</sup>, a maioria dos pacientes deveria receber TARV.

A falta de aderência à TARV, o abandono do seguimento ambulatorial e consequentemente a ausência do diagnóstico e do tratamento da infecção latente pelo *M. tuberculosis*, culminam com o adoecimento por TB. O uso de álcool e drogas, situação de rua, desnutrição, infecção pelo HIV, entre outras, são condições frequentemente observadas nessa população. Esses indivíduos necessitam de tratamento com equipe multidisciplinar, com especial atenção a prevenção e tratamento da TB, do contrário a tuberculose continuará como a principal causa de morte em pacientes com AIDS, especialmente nos mais vulneráveis.

A doença ativa pelo *M. tuberculosis*, independentemente da forma clínica, constitui indicação de TARV. O momento ideal para início da TARV é motivo de discussão há muito tempo (Pozniak et al., 1999; Pedral-Sampaio et al., 2002; Karim et al., 2011).

Os ensaios clínicos multicêntricos que avaliaram o melhor momento para início da TARV demonstraram que existe benefício com o início precoce. O estudo CAMELIA observou redução de 1/3 dos óbitos quando a TARV foi iniciada após duas semanas de tratamento para TB, especialmente naqueles indivíduos com contagem de células T CD4+ inferior a 50 células/mm<sup>3</sup>. Nos pacientes com contagem de células TCD4+ maior que 50 células/mm<sup>3</sup> a TARV deve ser introduzida após a fase intensiva do tratamento da TB, ou seja, após a 8ª semana (Blanc et al., 2011).

O início concomitante do tratamento da TB e a TARV não deve ser encorajado, uma vez que pode aumentar o risco de toxicidade e intolerância aos fármacos, com grande dificuldade de identificar qual o fármaco envolvido (Sanne et al., 2005; Schiffer, Sterling, 2007). Está indicado o início da TARV em todo paciente coinfectado (TB/HIV), independentemente da contagem de linfócitos T CD4+ e da forma clínica da TB, todavia, o momento da introdução da TARV deve ser avaliado

caso a caso, geralmente duas a 8 semanas após o início do tratamento da TB. Ressalta-se que a TARV não deverá ser adiada em razão da indisponibilidade do exame de LT-CD4+ (Dean et al., 2002; Corbett et al., 2003; Cohen, Meintjes, 2010; Ministério da Saúde, 2013). Nessa população de infectados pelo HIV com TB doença a incidência de reação paradoxal é maior do que nos não infectados pelo HIV, portanto, o profissional deve ficar alerta para a presença de sinais e sintomas de exacerbação da tuberculose, que podem surgir após a segunda ou terceira semana de tratamento da TB e da TARV (Lawn et al., 2005a, 2005b; Bourgarit et al., 2006; Serra et al., 2007; Pepper et al., 2009; Meintjes et al., 2010; Muller et al., 2010; Naidoo et al., 2012).

Quanto ao desempenho dos testes na TB doença, a especificidade do TT é baixa, pois o PPD contém diversos antígenos compartilhados por diferentes espécies de micobactérias, como as micobactérias do ambiente, *M. tuberculosis* e *M. bovis* (BCG) (Huebner et al., 1993; Andersen et al., 2000).

Em estudos anteriores a especificidade do IGRA e do TT em imunocompetentes vacinados com o BCG foi de 98,1% e 68,1% respectivamente, porém parece mais difícil determinar a sensibilidade do IGRA (Palazzo et al., 2008; Diel et al., 2011).

Alguns estudos com TB doença revelaram sensibilidade do IGRA de 64 a 87% (Balcells et al., 2008; Dheda et al., 2009). Estudo realizado no Japão com 107 pacientes infectados pelo HIV, observou que naqueles pacientes com diagnóstico de TB doença, o IGRA foi positivo em todos com  $CD4 > 50$  células/mm<sup>3</sup> e negativo nos pacientes com  $CD4 < 50$  células/mm<sup>3</sup> (Fujita et al., 2011).

Em nosso estudo, talvez a vacinação com o BCG não tenha influenciado no resultado do TT, a maioria dos pacientes com TB doença apresentou TT negativo, pois, acreditamos que a questão fundamental nessa população é a imunossupressão de célula T, o que pode levar ao resultado falso-negativo do TT.

No Brasil, a vacina é aplicada ao nascer e a população do estudo é composta por indivíduos com mais de 18 anos, ou seja, todos com mais de 15 anos da aplicação do BCG. Alguns estudos sugerem que o resultado do TT pode ser influenciado pela vacinação com BCG apenas nos dois primeiros anos (Joos et al.,

2006). Estudo realizado na Etiópia com estudantes saudáveis utilizando o TT e o Quantiferon®-TB Gold In-Tube para o diagnóstico da infecção latente pelo *M. tuberculosis*, não mostrou influência da vacinação com BCG no resultado do TT (Dagnew et al., 2012). Todavia, a maioria dos estudos defende a ideia que o BCG influencia no resultado do TT, desta forma, considera essa uma grande vantagem do IGRA (Mahan et al., 2011; Wolf et al., 2013).

Desta forma, precisamos ser criteriosos nessa interpretação, levando-se em consideração há quanto tempo foi aplicado o BCG, se o estudo ocorreu em países de alta carga de TB, se o paciente é imunossuprimido, entre outras condições. A maior concordância do IGRA com o TT ocorre em não vacinados com o BCG, estudo na Itália observou taxas semelhantes de positividade do TT e do IGRA em imunodeprimidos (Bartalesi et al., 2009). Países com altas taxas de vacinação com BCG como a Turquia a discordância entre os testes (TT+/IGRA-) ocorreu em 47,5%, na Itália e Alemanha com baixas taxas de vacinação com BCG a discordância (TT+/IGRA-) ocorreu em apenas 6% e 7,2%, respectivamente. Na Espanha, a taxa de discordância foi de 8,9%, e o IGRA demonstrou melhor desempenho em idosos e nos vacinados com BCG (Cobanoglu et al., 2007; Dinser et al., 2008; Matulis et al., 2008; Bartalesi et al., 2009; Garcia-Gasalla et al., 2013).

No presente estudo o TT foi positivo em apenas 25,56% dos pacientes com TB doença, em comparação a 65,56% de IGRA positivo (Tabela 20), acreditamos que a baixa sensibilidade dos dois métodos (TT e IGRA) relaciona-se ao grave comprometimento imunológico da população estudada (valor médio de células T CD4+ de 198,92/mm<sup>3</sup>), com melhor desempenho do IGRA em comparação com o TT ( $p < 0,001$ ).

Recente revisão sistemática e metanálise, pesquisou os estudos publicados entre 1 janeiro de 2005 e 31 de julho de 2011, para avaliar o desempenho de IGRA para o diagnóstico da TB ou da ILTB em pacientes com AIDS. Os autores concluíram que o IGRA apresenta baixa precisão para confirmar ou descartar a TB doença em adultos com AIDS, embora o valor preditivo positivo para TB doença seja modesto, o valor preditivo negativo é alto. A sensibilidade estimada do Quantiferon®-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) a partir de 15 estudos com um total de 356 pacientes com diagnóstico de TB doença comprovada por cultura, foi de 61%

(95% IC= 54-67) e de 65% (95% IC= 56-74) para o T - SPOT.TB (Santin et al., 2012).

A baixa sensibilidade encontrada foi semelhante a de outros estudos com o IGRA para o diagnóstico da TB doença em infectados pelo HIV, e com isolamento do *M. tuberculosis* em cultura, esses estudos realizados em diferentes países como Singapura com sensibilidade do IGRA de 57% (Chee et al., 2008); Uganda (68%) (Leidl et al., 2010); África do Sul (67%) (Ling et al., 2011); África do Sul (20%) (Dheda et al., 2009).

Já os estudos que compararam o IGRA com o TT, revelaram sensibilidade reunida do IGRA de 67% (95% IC= 58-74) e do TT de 60% (95% IC= 34-82) (Tsiouris et al., 2006; Aichelburg et al., 2009; Kabeer et al., 2009; Garcia-Gasalla et al., 2010; Rangaka et al., 2012).

Pela dificuldade da interpretação do TT em pacientes infectados pelo HIV/AIDS com diferentes graus de imunodepressão, o IGRA poderá auxiliar o diagnóstico da ILTB e da TB doença nesta população, especialmente naqueles com imunodepressão em que o TT pode ser negativo (falso-negativo) (Denkinger et al., 2011).

Entre os fatores que podem influenciar no resultado indeterminado ou falso-negativo do IGRA em indivíduos com TB doença, estão: idade avançada, baixos valores de linfócitos, desnutrição (inibição da resposta imune específica) (Kobashi et al., 2009), genótipo do HLA, altos valores da Proteína C Reativa (PCR) e coinfeção pelo HIV (Hang et al., 2011; Kim et al., 2011; Banfield et al., 2012).

Esses estudos têm demonstrado que tanto o TT como o IGRA têm resultados falso-negativos naqueles indivíduos com imunossupressão grave, todavia, o IGRA pode apresentar melhor desempenho que o TT. O diagnóstico da TB doença em pacientes com AIDS deve pautar-se nos métodos convencionais de isolamento do agente como a baciloscopia, a cultura e os métodos moleculares (Boehme et al., 2010; World Health Organization, 2011a, 2011b, 2011c; Cobelens et al., 2012; Cuevas et al., 2012; McNerney et al., 2012).

Em nosso estudo quando comparados os dois testes, o IGRA foi mais eficaz por dois motivos: mostrou-se mais sensível, e com maior precisão (menor amplitude dos intervalos de confiança) e o segundo motivo, porque conseguiu maximizar sua sensibilidade com ponto de corte do CD4 menor do que o teste tuberculínico. Estimou-se, assim, que o IGRA foi capaz de diagnosticar TB com probabilidade de 93,75%, para pacientes com  $CD4 \geq 187$  células/mm<sup>3</sup>; enquanto que o teste tuberculínico (PPD5 e PPD10) necessitou que os pacientes apresentem CD4 pelo menos 2,5 vezes maior (473 e 563 células/mm<sup>3</sup>, respectivamente) e, ainda assim, não conseguiram alcançar a eficácia do IGRA (Tabela 24 e Figura 7).

O efeito da contagem de células T CD4+ sobre o resultado do TT e do IGRA, ainda é controverso. A influência da contagem de células T CD4 + sobre a sensibilidade do IGRA foi avaliada em três estudos com QFT-GIT (Kabeer et al., 2009; Kabeer et al., 2010; Ling et al., 2011). Um estudo revelou que a sensibilidade do IGRA (QFT-GIT) é menor nos pacientes com contagem de células T CD4+ menor que 200 células/mm<sup>3</sup> (Kabeer et al., 2009), e em outro não encontrou diferenças (Kabeer et al., 2010).

Outro aspecto que deve ser considerado é que o ponto de corte sugerido pelo fabricante para o TBAg- Nil é de 0,35 UI/mL para a TB latente, talvez não seja o ideal nos imunodeprimidos com ILTB e TB doença, considerando-se também que o IGRA foi recentemente aprovado para o diagnóstico diferencial da TB doença.

O Quantiferon®-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) mede a produção de interferon gama pelas células T frente a antígenos peptídeos que simulam as proteínas da micobactéria (ESAT 6, CFP 10). Os linfócitos do sangue periférico de pacientes com ILTB ou TB doença reconhecem e secretam citocinas (IFN- $\gamma$ ) e o teste detecta e quantifica o IFN- $\gamma$ , portanto, essa resposta é claramente dependente do número e função dos linfócitos T, muito comprometida na população do estudo e, portanto, talvez seja necessário estabelecer um novo valor de corte para o diagnóstico diferencial da TB doença em pacientes imunossuprimidos com baixos valores de células T CD4 +. O ideal seria avaliar a resposta por estudos clínicos em diferentes regiões com alta e baixa prevalência da TB (Vesenbeckh et al., 2012).

No presente estudo observamos que o IGRA apresentou menores valores do TB Ag-Nil nos indivíduos com valores mais baixos de células T CD4 + (Figura 9) e

ainda a possibilidade de resultados falso-negativos naqueles com contagem de células T CD4+ menor que 187 células/mm<sup>3</sup>, já o TT apresentou resultados falso-negativos naqueles com contagem de células T CD4+ menor que 473 células /mm<sup>3</sup> (Tabela 24).

Assim, mais estudos são necessários para estabelecer o verdadeiro papel dos IGRAs para o diagnóstico da TB doença em infectados pelo HIV. Uma das limitações desse estudo é que os pacientes do grupo 2, foram selecionados a partir do diagnóstico de certeza da tuberculose (isolamento do agente), assim a análise da especificidade, VPP e VPN não foram possíveis. O ideal seria selecionar todos os pacientes com suspeita de tuberculose doença. Os dados do presente estudo, sugerem que tanto o TT como o IGRA tiveram uma resposta pobre em coinfectados HIV/TB e devem ser desencorajados para o diagnóstico da TB doença. Alguns autores em publicações recentes reconhecem o papel do IGRA na infecção latente pelo *M. tuberculosis*, todavia consideram seu papel limitado no diagnóstico da TB doença em pacientes com AIDS (Cattamanchi et al., 2011; World Health Organization, 2011a, 2011b, 2011c; Santin et al., 2012).

### 5.3 Grupo 3 (não infectados pelo HIV com ILTB)

Os indivíduos do grupo 3 composto por 90 pacientes sem infecção pelo HIV com risco de ILTB apresentaram algumas características diferentes dos demais grupos, aqui a maioria era do sexo feminino (61,11%), atendidos no ICF (67,78%), média de idade de 44,56 ( $\pm 13,32$ ) e mais da metade dos indivíduos tinha risco baixo de infecção pelo *M. tuberculosis* (57,78%) (Tabela 26 e 27).

Os indivíduos desse grupo foram convocados para investigação por serem contatos de casos de TB. Observou-se que as mulheres compareceram mais as consultas, talvez as mulheres, com média de idade maior e em maior número (em 2010 a população urbana do país era composta por 77.710.174 homens e 83.215.618 mulheres)(Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011), compareçam mais as consultas para investigação do que os homens. Outro ponto interessante é que a maioria apresentou risco baixo de infecção pelo *M.*

*tuberculosis*, todavia o contato foi mais longo (9 meses) do que os indivíduos do grupo 1 (três meses).

Na análise dos resultados do TT e do IGRA observamos que com base nos testes de McNemar e Kappa que os testes não concordam, a maior discordância ocorreu com TT positivo e IGRA negativo (TT+/IGRA-) (Tabela 29).

As explicações possíveis para a discordância são: a interferência do BCG e de micobactérias ambientais (TT falso-positivo) e no caso de infecção antiga pelo *M. tuberculosis*, ou em indivíduos mais idosos a negatificação do IGRA (reversão). A reversão do resultado do IGRA foi observada por Zwerling et al. (2012), em países de baixa e alta carga de TB o que pode contribuir para discordância do IGRA com o TT.

Entre os fatores que podem influenciar para a negatificação do IGRA podemos citar o envelhecimento, emagrecimento (IMC menor que 16), coinfeção com HIV e genótipo HLA (Hang et al., 2011). Essa população era composta por indivíduos com idade superior aos demais grupos 1 e 2. Outra questão é que de fato o IGRA associa-se melhor com o risco do que o TT ( $p < 0,001$ ), nesse grupo 57,78% apresentava risco baixo de infecção pelo *M. tuberculosis* (Tabela 27).

Dos 90 indivíduos sem infecção pelo HIV com risco de ILTB, três pacientes não se infectaram (TT e IGRA negativos) e 87 preencheram os critérios do estudo para o diagnóstico de ILTB (risco definido de ILTB e pelo menos um dos testes positivos, TT ou IGRA). Quanto ao resultado dos exames nos 87 pacientes sem infecção pelo HIV com ILTB, observou-se que o TT foi positivo em 95,40% e negativo em 4,60% (Tabela 30). Já o IGRA foi positivo em 79,31% e negativo em 20,69% (Tabela 31).

Quando utilizou-se o coeficiente de concordância Kappa para avaliar a concordância dos testes com o diagnóstico de ILTB, o TT demonstrou concordância moderada (Kappa: 0,580) e o IGRA, fraca concordância (Kappa: 0,214). Ambos os testes apresentaram boa sensibilidade (acima de 92%), a especificidade do TT (7,69%) e do IGRA (38,46%) utilizando como padrão-ouro o risco foi muito baixa, o VPN do IGRA foi alto (95,24%) (Tabela 36), desta forma podemos considerar que nessa população o TT é um bom teste de triagem, e o resultado negativo do IGRA indica grande possibilidade do indivíduo não apresentar ILTB.

Revisão sistemática recente e metanálise na tentativa de determinar o valor preditivo do IGRa para o adoecimento por TB, avaliou 15 estudos com 26.680 indivíduos, com seguimento de quatro anos (variando nos estudos de dois a seis anos), revelou que a incidência de TB doença no período de seguimento foi baixa, a associação entre IGRa positivo e desenvolvimento de TB doença nestes estudos é fraca. Nestes estudos observou-se que a proporção de TT positivo é maior do que a proporção de IGRa positivo, revelando maior sensibilidade do TT e maior especificidade do IGRa, portanto nas populações onde a especificidade do TT pode estar comprometida como nas situações de reações cruzadas com micobactérias ambientais, vacinação com BCG ou múltiplas vacinações com BCG, o uso do IGRa deve ser encorajado (Rangaka et al., 2012).

Sabemos que o interferon gama pode ser produzido em várias fases da infecção pelo *M. tuberculosis*, desde as fases iniciais, na doença ativa e após o tratamento da doença, assim, o teste ganha mais importância quando associado aos fatores de risco conhecidos, sugerindo-se em algumas publicações um sistema de pontuação para o risco. Entre as variáveis citadas nos estudos estão a idade, infecção recente em crianças, contato recente com bacilífero e infecção pelo HIV (Mazurek et al., 2010; Anibarro et al., 2011). Desta forma consideramos a avaliação criteriosa dos riscos fundamental.

Outro perfil de discordância entre os testes é o TT negativo com IGRa positivo, alguns estudos sugerem que o IGRa na infecção aguda pelo *M. tuberculosis* se torne positivo mais rápido que o teste tuberculínico (Lalvani, 2007; Balcells et al., 2008; Mazurek et al., 2010; Anibarro et al., 2011).

Com base na correlação linear negativa entre os níveis de interferon gama e o número dos neutrófilos (níveis crescentes de interferon gama relacionam-se com neutrófilos decrescentes), discute-se porque alguns indivíduos com o mesmo grau de exposição à pacientes bacilíferos, levam mais tempo para serem infectados do que outros, sugere-se assim, o papel da resposta inata em que os neutrófilos desempenham importante função. Para responder a essa pergunta foi realizado estudo com 88 contatos domiciliares de bacilíferos, 8 pacientes não retornaram para leitura do TT, assim 80 pacientes realizaram TT (ponto de corte 10 mm) e IGRa. Dos 38 pacientes com TT negativo, o IGRa foi positivo em cinco e negativo em 33 e



naqueles com TT positivo (42 pacientes) o IGRA foi positivo em 24 e negativo em 18, não observou-se alterações estatisticamente significantes do hemograma entre indivíduos infectados e não infectados pelo *M. tuberculosis* e não houve correlação entre o resultado do TT e/ou do IGRA e a contagem de células no sangue periférico (hemograma) (Takenami et al., 2013).

Quanto ao tratamento da infecção latente pelo *M. tuberculosis* no grupo 3, após a realização do estudo 57,78% dos pacientes receberam tratamento para infecção latente pelo *M. tuberculosis* com isoniazida (Tabela 37). Observou-se então que o tratamento da ILTB apesar de realizado na maioria dos pacientes, de acordo com o diagnóstico de ILTB poderia ter sido administrado em 87 pacientes (96,66%).

Em 2008, Diel et al., publicaram estudo onde acompanharam por dois anos 601 contatos de pacientes com TB pulmonar bacilífera que realizaram TT e IGRA. Dos 601 contatos o TT foi positivo em 243 (40%) e o IGRA em 66 (11%). Daqueles com IGRA positivo, apenas 25 receberam tratamento para ILTB e nenhum adoeceu no período de dois anos, e dos 41 pacientes que não receberam tratamento para ILTB 14,6% adoeceram. Dos 535 pacientes que apresentaram IGRA negativo nenhum adoeceu no período do estudo (Diel et al., 2008). Com base em vários estudos, o VPN do IGRA deve ser considerado nessa população, especialmente nos países que utilizam amplamente a vacinação com BCG.

#### 5.4 Comparação do grupo 1 com o grupo 2

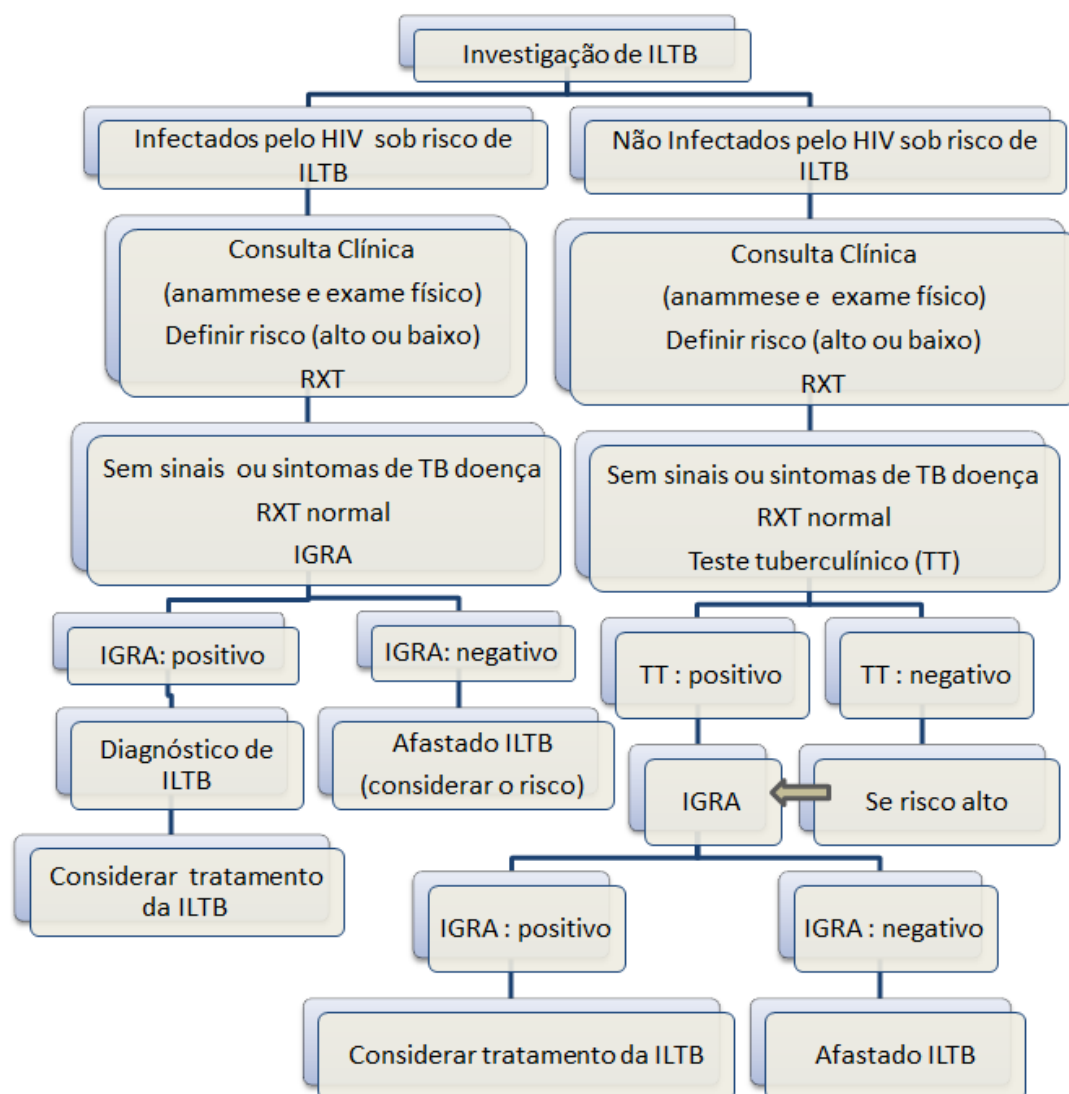
Na comparação do grupo 1 com o grupo 2, observou-se que o grupo 2 é composto por pacientes mais imunossuprimidos, valores mais baixos de células T CD4, T CD8, e carga viral bem mais alta (Tabela 38 e Figuras 10, 11 e 12). No grupo 1 a maioria fazia uso regular de TARV (93,33%), todavia, no grupo 2 apesar da indicação evidente de TARV, apenas 63,33% dos pacientes usavam. Vários fatores parecem estar envolvidos na baixa adesão à TARV, entre eles questões sociais e o uso de álcool e drogas, condições muito presentes nos infectados pelo HIV/AIDS que procuram o IIER para internação.

### 5.5 Fluxograma proposto para investigação da infecção latente pelo *M. tuberculosis* (ILTB)

Os indivíduos infectados pelo HIV sob risco de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* com IGRA negativo, têm grande possibilidade de não apresentar a infecção latente (VPN: 93,33%) e os indivíduos infectados pelo HIV sob risco de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* com IGRA positivo, têm grande possibilidade de estar com infecção latente (VPP: 90,67%).

Com base nesses resultados e com as considerações já feitas no início da discussão do Grupo 1 e do Grupo 3, propomos um fluxograma para investigação da ILTB, onde para os indivíduos infectados pelo HIV, sob risco de ILTB após consulta clínica e definição do risco, com radiografia de tórax normal e sem sinais ou sintomas de TB doença, propõem-se a realização do IGRA, se positivo, inicia-se o tratamento da ILTB e se negativo, afasta-se a infecção latente pelo *M. tuberculosis*. A realização concomitante do TT pode ser realizada, todavia frente ao melhor desempenho do IGRA nessa população, não julgamos necessário a realização dos dois testes a não ser para comparação dos métodos em estudos clínicos.

Na população não infectada pelo HIV com risco de ILTB (Grupo 3) o TT teve boa sensibilidade e concordância moderada com o diagnóstico de ILTB, desta forma, pode ser utilizado como teste de triagem. A presença de TT positivo ou naqueles com TT negativo mas com risco alto de infecção pelo *M. tuberculosis* o IGRA pode ser realizado, se o IGRA for positivo indica-se o tratamento para ILTB e se negativo afasta-se ILTB (Figura 14).



**Figura 14.** Fluxograma proposto para investigação da infecção latente pelo *M. tuberculosis* (ILTb).

Em estudo sobre reatividade ao teste intradérmico com derivado proteico purificado (PPD) e o desenvolvimento de TB em infectados ou não pelo HIV, Selwyn et al. (1989) observaram que entre os infectados pelo HIV reatores ao PPD, 14% evoluíram para TB doença no período de dois anos. Em contrapartida, nos não infectados a taxa estimada para a reativação ao longo da vida foi de 10%. Esses autores concluíram que o mecanismo de reativação era importante em infectados pelo HIV com risco de adoecimento de 5 a 15% ao ano ou 50% ao longo da vida (Moran-Mendoza et al., 2007; Andrews et al., 2012; McNerney et al., 2012). Considerando-se o risco elevado de adoecimento por TB nos pacientes infectados pelo HIV, aqueles com IGRA positivo deveriam receber tratamento para ILTB.

Questões atuais são o tempo de tratamento, seis, 9 meses ou até 36 meses naqueles mais imunossuprimidos que vivem em países de elevada incidência de TB; quais fármacos utilizar (preferência pela INH); se esta indicada a supervisão do tratamento para os pacientes com aids ou em situações especiais; nos contatos de pacientes com TB multirresistente (TBMR), quais fármacos utilizar. A maioria dos estudos defende que nos infectados pelo HIV o tratamento da ILTB deve ser com INH por 9 meses, de preferência tratamento supervisionado, e no caso de TBMR o tratamento deve ser individualizado (Comstock, 1999; American Thoracic Society, 2000; Akolo et al., 2010; Martinson et al., 2011; Sterling et al., 2011; Seddon et al., 2012; Abubakar et al., 2013).

## 5.6 Fragilidades do estudo

Em relação à ILTB nos grupos de infectados e não infectados pelo HIV a utilização do risco de infecção pelo *M. tuberculosis* como padrão-ouro, acreditamos que foi um bom critério, todavia, nosso estudo foi transversal e o seguimento com repetição dos exames para avaliar a conversão ou reversão de ambos seria interessante para associar com o risco, principalmente naqueles que discordaram quanto aos resultados do TT e do IGRAs. Outra vantagem dos estudos longitudinais é a possibilidade de avaliar o adoecimento por TB.

No grupo 2 (coinfectados HIV/TB) adotamos critérios de inclusão a partir do isolamento do *M. tuberculosis* ou exame anatomopatológico compatível com TB, critério utilizado frente aos inúmeros diagnósticos diferenciais em pacientes com AIDS e pela possibilidade de doença por outras micobactérias, essa seleção encontra bases sólidas para o diagnóstico de certeza da doença, todavia, mais interessante seria incluir aqueles com suspeita de TB, realizar os testes e correlacionar os resultados após a confirmação do diagnóstico da doença. Em algumas formas extrapulmonares da TB o isolamento do bacilo é difícil, nessas situações, frente a suspeita clínica, o IGRAs poderia auxiliar. Outra questão é que esse grupo de pacientes (HIV/TB doença) é composto por pacientes muito imunossuprimidos (média de linfócitos T CD4 de 198,92 células/mm<sup>3</sup>), população em que a sensibilidade do TT e do IGRAs pode ser mais baixa, o ideal seria comparar

populações maiores com diferentes estádios de imunossupressão. Outro desafio científico é o fato do IGRA, assim como o TT, não ser capaz de diferenciar ILTB de TB doença, com resultado positivo desde as fases precoces da infecção tuberculosa até a TB pós-primária.

### **5.7 Considerações finais**

Os resultados do estudo parecem nortear a investigação da ILTB em pacientes infectados pelo HIV sob risco de ILTB, possibilitando o diagnóstico e indicação mais precisa de tratamento. Naqueles sem infecção pelo HIV a utilização do IGRA para o diagnóstico da ILTB deverá ocorrer em situações pontuais. Na TB doença o isolamento do agente ainda deve ser almejado, o uso do IGRA e do TT para o diagnóstico da doença deve ser desencorajado, pois os testes não foram adequados nesta situação.

## 6. CONCLUSÕES

---

**Na detecção da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ILTB):**

- Nos infectados pelo HIV o IGRA demonstrou melhor desempenho que o teste tuberculínico (TT) e melhor associação com o risco de infecção pelo *M. tuberculosis*.
- Nos não infectados pelo HIV a sensibilidade do TT e do IGRA foi semelhante, o TT demonstrou melhor associação com a detecção de ILTB, todavia, o valor preditivo negativo do IGRA foi melhor.

**Nos indivíduos infectados pelo HIV com tuberculose doença:**

- O IGRA mostrou melhor desempenho que o TT e foi capaz de detectar a doença em pacientes mais imunodeprimidos, porém, os dois testes apresentaram baixa sensibilidade e não foram apropriados para o diagnóstico da doença.





# ***QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold***

***(Método in-tube)***

Teste de interferção-gama para sangue total,  
para medição de respostas aos  
péptidos antigénicos ESAT-6, CFP-10 & TB7.7(p4)

FOLHETO INFORMATIVO

Para diagnóstico *in vitro*



## ÍNDICE

1. FINALIDADE	2
2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE	2
Princípios da análise	3
Tempo necessário para realizar a análise	3
3. REAGENTES E ARMAZENAGEM	4
Materiais necessários (mas não fornecidos)	4
Instruções de conservação	5
Tubos para colheita de sangue	5
Kit de reagentes	5
Reagentes reconstituídos e não usados	5
4. AVISOS E PRECAUÇÕES	6
Avisos	6
Precauções	7
5. COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS	8
6. INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO	9
FASE UM – Incubação de sangue e colheita de plasma	9
FASE DOIS – Interferão- $\gamma$ humano ELISA	10
7. CÁLCULOS E INTERPRETAÇÃO DO TESTE	13
Geração da curva standard	13
Controlo da qualidade do teste	14
Interpretação dos resultados	14
8. LIMITAÇÕES	18
9. CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO	18
10. INFORMAÇÃO TÉCNICA	20
Resultados inconclusivos	20
Amostra de plasma coagulado	20
Resolução de problemas ELISA	21
Desenvolvimento cromático não-específico	21
Leituras de baixa Densidade Óptica para Standards	21
Fundo de cor intensa	22
Curva standard não-linear e variabilidade entre as amostras duplas	22
11. BIBLIOGRAFIA	23
12. ASSISTÊNCIA TÉCNICA	24
13. PROCEDIMENTO ABREVIADO DO TESTE	25

## 1. FINALIDADE

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) é um teste para diagnóstico *in vitro* que utiliza um cocktail de péptidos simulando as proteínas ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4), a fim de estimular as células no sangue total heparinizado. A detecção de interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) pelo Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) é usada para identificar respostas *in vitro* a estes péptidos antigénicos, os quais estão associados à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

QuantiFERON®-TB Gold IT é um teste indirecto à infecção por *M. tuberculosis* (incluindo a doença) e deve ser usado em conjunto com a avaliação de riscos, a radiografia e outras avaliações médicas e de diagnóstico.

## 2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

A tuberculose é uma doença comunicável causada pela infecção com organismos complexos *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), os quais tipicamente se transmitem por via aérea a novos hospedeiros, através de núcleos de gotículas provenientes de pacientes com tuberculose respiratória. Um indivíduo recentemente infectado pode ficar doente com tuberculose no espaço de semanas ou meses, mas a maioria dos indivíduos infectados permanece saudável. Em alguns indivíduos persiste uma infecção latente de tuberculose (LTBI), um estado assintomático incomunicável que pode degenerar em tuberculose meses ou anos mais tarde. A finalidade principal ao diagnosticar a LTBI é considerar o tratamento médico para evitar a doença. Até há pouco tempo, o teste cutâneo da tuberculina (TST) era o único método disponível para diagnosticar a LTBI. A sensibilidade cutânea à tuberculina desenvolve-se entre 2 a 10 semanas após a infecção. Contudo, alguns indivíduos infectados – incluindo aqueles cuja vasta série de circunstâncias impede as funções imunitárias, mas também outros sem estas condicionantes – não reagem à tuberculina. Ao contrário, alguns indivíduos sem probabilidade de infecção com *M. tuberculosis* apresentam sensibilidade à tuberculina e exibem resultados positivos no TST após vacinação com o bacilo Calmette-Guérin (BCG), por infecção com micobactérias que não as do complexo *M. tuberculosis* ou devido a outros factores não determinados.

A LTBI tem de ser distinguida da tuberculose doença, uma situação que tem de ser reportada e que, normalmente, implica os pulmões e o tracto respiratório inferior, apesar de também poder afectar outros sistemas de órgãos. A tuberculose doença é diagnosticada a partir de conclusões retiradas da avaliação histórica, física, histológica e microbiológica.

O teste QuantiFERON®-TB Gold IT é um teste às respostas imunológicas celulares (CMI) perante péptidos antigénicos que simulam proteínas micobacterianas. Estas proteínas (ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4)) estão ausentes de todas as estirpes do BCG e da maioria das micobactérias não-tuberculosas, à excepção de *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum*.<sup>1</sup> Indivíduos infectados com organismos do complexo *M. tuberculosis* normalmente têm linfócitos no sangue que reconhecem estes e outros antígenos micobacterianos. Este processo de reconhecimento envolve a geração e a secreção da citocina IFN- $\gamma$ . A detecção e subsequente quantificação de IFN- $\gamma$  constituem a base deste teste.

Os antígenos usados no QuantiFERON®-TB Gold IT formam um cocktail de péptidos que simulam as proteínas ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4). Numerosos estudos demonstraram que estes péptidos antigénicos estimulam as respostas ao IFN- $\gamma$  em células T por parte de indivíduos infectados com *M. tuberculosis*, mas geralmente não por parte de pessoas não infectadas ou vacinadas com BCG, sem doença nem risco de LTBI.<sup>1-32</sup> Contudo, os tratamentos ou estados clínicos que fragilizam a funcionalidade imunitária podem reduzir as respostas ao IFN- $\gamma$ . Pacientes com determinadas outras infecções micobacterianas também podem reagir a ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4), visto que os genes que codificam essas proteínas estão presentes em *M. kansasii*, *M. szulgai* and *M. marinum*.<sup>1,23</sup> O teste QuantiFERON®-TB Gold IT é tanto um teste para a LTBI como um auxiliar útil para diagnosticar a infecção com o complexo *M. tuberculosis* em pacientes doentes. Um resultado positivo sustenta o diagnóstico da tuberculose doença; contudo, as infecções por outras micobactérias (p. ex., *M. kansasii*) também poderiam levar a resultados positivos. São necessárias outras avaliações médicas e de diagnóstico para confirmar ou excluir a tuberculose doença.

### **Princípios da análise**

O sistema QuantiFERON®-TB Gold IT utiliza tubos especiais para colheita de sangue total. A incubação do sangue ocorre nos tubos durante 16 a 24 horas, após as quais o plasma é colhido e testado quanto à presença de IFN- $\gamma$  produzido como resposta aos péptidos antigénicos.

O teste QuantiFERON®-TB Gold IT é realizado em duas fases. Primeiro, o sangue total é recolhido para dentro de cada um dos tubos para colheita de sangue do QuantiFERON®-TB Gold: um tubo de controlo nulo, um tubo de antígeno da TB e um tubo opcional de agente mitogénico.

O tubo de agente mitogénico pode ser usado com o teste QuantiFERON®-TB Gold IT como controlo positivo. Isso pode justificar-se caso haja dúvidas sobre a situação imunológica do indivíduo. O tubo de agente mitogénico também pode servir de controlo para manuseamento e incubação correctos do sangue.

Os tubos devem ser incubados a 37°C o mais cedo possível e no espaço de 16 horas a contar da colheita. Na sequência de um período de incubação de 16 a 24 horas, os tubos são centrifugados, o plasma é retirado e a quantidade de IFN- $\gamma$  (UI/mL) é medida pelo ELISA.

Um teste é considerado positivo no caso de uma resposta do IFN- $\gamma$  ao tubo de antígeno da TB que se situe significativamente acima do valor nulo UI/mL de IFN- $\gamma$ . Caso seja usada, a amostra de plasma estimulada pelo agente mitogénico serve de controlo positivo do IFN- $\gamma$  para cada amostra testada. Uma resposta reduzida ao agente mitogénico (<0,5 UI/mL) indica um resultado inconclusivo caso uma amostra de sangue também tenha uma resposta negativa ao antígeno da TB. Este padrão pode verificar-se em caso de linfócitos insuficientes, de actividade linfocitária reduzida devido ao manuseamento inadequado das amostras, de enchimento/mistura incorrectos do tubo de mitogénio ou da incapacidade dos linfócitos do paciente para gerar IFN- $\gamma$ . A amostra nula corrige os efeitos de reacções não específicas, de anticorpos heterófilos<sup>7</sup> ou IFN- $\gamma$  não específico em amostras de sangue. O nível de IFN- $\gamma$  do tubo nulo é subtraído ao nível de IFN- $\gamma$  do tubo de antígeno da TB e do tubo do agente mitogénico (caso seja usado).

### **Tempo necessário para realizar a análise**

Calcula-se que o tempo necessário para realizar a análise QuantiFERON®-TB Gold IT seja reduzido; também é indicado o tempo para testar amostras múltiplas quando agrupadas:

Incubação a 37°C dos tubos de sangue: 16 a 24 horas

ELISA: Aprox. 3 horas para uma placa ELISA (28 a 44 indivíduos)

- <1 hora de trabalho
- Adicione 10 a 15 minutos para cada placa extra

### 3. REAGENTES E ARMAZENAGEM

#### Tubos para colheita de sangue

#### Antigénio da tuberculose e de controlo

N.º do catálogo 0590 0301

1. Controlo nulo (tampa cinzenta)	100 x tubos
2. Antigénio da TB (tampa vermelha)	100 x tubos
3. Controlo do agente mitogénico (tampa púrpura)	100 x tubos

*NOTA: Também estão disponíveis tubos noutras configurações:*

*Cat n.º 0590-0201: 100 x controlo nulo, 100 x tubos para antigénio da TB.*

*Cat n.º 0593-0201: 100 x tubos de controlo de agente mitogénico.*

#### **Tubos para altitudes elevadas (consulte a secção 5)**

*Cat. N.º 590 0501: (altitude elevada) 100 x controlo nulo, 100 x tubos para antigénio da TB.*

*Cat n.º 0590-0505: (altitude elevada) 100 x controlo nulo, 100 x tubos para antigénio da TB & 100 x tubos para agente mitogénico.*

*Cat. N.º T0593 0501 (altitude elevada) 100 x tubos de controlo de agente mitogénico.*

#### Componentes do ELISA

N.º do catálogo 0594 0201

1. Fitas de microplacas	24 x 8 poços
2. Standard de IFN- $\gamma$ humano, liofilizado	1 x frasco
3. Diluente Verde	1 x 30mL
4. Conjugado 100X Concentrado, liofilizado	1 x 0,3mL
5. Tampão de Lavagem 20X Concentrado	1 x 100mL
6. Solução de Substrato Enzimático	1 x 30mL
7. Solução de Paragem Enzimática	1 x 15mL

#### Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Incubadora de 37 °C. CO<sub>2</sub> não necessário.
- Pipetas calibradas de volume variável (10µL a 1000µL) com pontas descartáveis.
- Pipeta calibrada multicanal (50µL e 100µL) com pontas descartáveis.
- Agitador de microplacas.
- Água desionizada ou destilada - 2L.
- Lavador de microplacas (recomendado um lavador automático).
- Leitor de microplacas equipado com filtro de 450nm e filtro de referência de 620nm a 650nm.

### **Instruções de conservação**

#### **Tubos para colheita de sangue**

- Conserve os tubos para colheita de sangue entre 4°C e 25°C.
- A duração dos tubos para colheita de sangue QuantiFERON®-TB Gold é de 15 meses a contar da data de fabrico, se conservados entre 4°C e 25°C.

#### **Kit de reagentes**

- Conserve o kit entre 2°C e 8°C.
- Proteja sempre a Solução de Substrato Enzimático da luz solar directa.
- A duração do kit IT ELISA QuantiFERON®-TB Gold é de 3 anos a contar da data de fabrico, se conservado entre 2°C e 8°C.

#### **Reagentes reconstituídos e não usados**

Consulte a secção 6 (página 11) para mais instruções sobre como reconstituir os reagentes.

- O Kit Standard reconstituído pode de ser guardado até 3 meses, se conservado entre 2°C e 8°C.
  - *Anote a data em que o Kit Standard foi reconstituído.*
- Uma vez reconstituído, o Conjugado 100X Concentrado não usado tem de voltar a ser conservado entre 2°C e 8°C e de ser usado no espaço de 3 meses.
  - *Anote a data em que o Conjugado foi reconstituído.*
- O Conjugado pronto tem de ser usado no espaço de 6 horas a contar do momento da preparação.
- O tampão de lavagem pronto a usar pode ser conservado à temperatura ambiente durante até 2 semanas.



#### 4. AVISOS E PRECAUÇÕES

##### Avisos

- Um resultado negativo de QuantiFERON®-TB Gold IT não exclui a possibilidade de infecção com *M. tuberculosis* nem de tuberculose doença: Resultados falsos-negativos podem dever-se ao estágio da infecção (p. ex., amostra obtida antes do desenvolvimento da resposta imunológica celular), estados co-mórbidos que afetem as funções imunitárias, manuseamento incorrecto dos tubos de colheita de sangue a seguir à venipunctura, realização incorrecta da análise ou outras variáveis imunológicas.
- Um resultado positivo de QuantiFERON®-TB Gold IT não deve ser a única base - nem a definitiva - de determinação da infecção com *M. tuberculosis*. A realização incorrecta da análise pode causar respostas falsas-positivas.
- Um resultado positivo de QuantiFERON®-TB Gold IT deve ser seguido de avaliação médica mais exaustiva e de avaliação do diagnóstico quanto à tuberculose doença activa (p. ex., exame e cultura de bacilo ácido-resistente na expectoração, raio-X do tórax).
- Enquanto ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4) estão ausentes de todas as estirpes do BCG e da maioria das micobactérias não-tuberculosas mais conhecidas, é possível que um resultado positivo QuantiFERON®-TB Gold IT se deva a uma infecção por *M. kansasii*, *M. szulgai* ou *M. marinum*. *Se houver suspeita de uma dessas infecções, devem ser investigados testes alternativos.*

### Precauções

- **Para diagnóstico *in vitro*.**
- **Nocivo:** A Solução de Substrato Enzimático contém 3,3',5,5' de tetrametilbenzidina, a qual é nociva por ingestão, inalação e contacto cutâneo. Irritante para pele e olhos. Mutagénica. Use protecção ocular e luvas e manuseie como potencial carcinogénico.
- **Nocivo:** Solução de Paragem Enzimática contém H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o qual é nocivo por ingestão, contacto com olhos, pele e por inalação. Use protecção ocular, luvas e vestuário protector normal de laboratório. Se a solução de paragem entrar em contacto com a pele ou os olhos, lave com água abundante e consulte o médico.
- **Nocivo:** Standard de IFN- $\gamma$  e Conjugado 100X Concentrado podem ser desconfortáveis se ingeridos e podem causar irritação cutânea. Use luvas e vestuário protector normal de laboratório.
- **Manuseie o sangue humano como potencialmente infeccioso.** Observe as directrizes relevantes em matéria de manuseamento de sangue.
- **Timerosal** é usado como conservante em alguns reagentes. Pode ser tóxico após ingestão, inalação ou contacto cutâneo.
- **Diluyente Verde** contém soro normal de ratinho e caseína, os quais podem desencadear reacções alérgicas; evite o contacto com a pele.
- Desvios em relação ao Folheto informativo podem causar resultados erróneos. Por favor, queira ler as instruções cuidadosamente antes da utilização.
- Não utilize o kit se algum frasco de reagente mostrar sinais de danos ou de fugas antes da utilização.
- Não misture nem use reagentes ELISA de outros lotes de kits QuantiFERON®-TB Gold.
- Elimine reagentes não utilizados e amostras biológicas de acordo com as regulamentações locais e nacionais.
- Não utilize tubos de colheita de sangue nem o kit ELISA após expirar a data de validade.



## 5. COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

QuantiFERON®-TB Gold IT usa os seguintes tubos de colheita:

1. Controlo nulo (tampa cinzenta com anel branco) (para alturas até 810 m acima do nível do mar)
2. Antígeno da TB (tampa vermelha com anel branco) (para alturas até 810 m acima do nível do mar)
3. Controlo do agente mitogénico (tampa púrpura com anel branco) (para alturas até 810 m acima do nível do mar) (opcional)
4. Controlo nulo (tampa cinzenta com anel amarelo) (para alturas entre 1.020 e 1.875 m)
5. Antígeno da TB (tampa vermelha com anel amarelo) (para alturas entre 1.020 e 1.875 m)
6. Controlo do agente mitogénico (tampa púrpura com anel amarelo) (para alturas entre 1.020 e 1.875 m) (opcional)

Os antígenos secaram na parede interior dos tubos de colheita de sangue, por isso é essencial que o conteúdo dos tubos seja totalmente misturado com o sangue. Os tubos devem ser transferidos para uma incubadora de 37°C o mais cedo possível e no espaço de 16 horas a contar da colheita.

Devem ser cumpridos os seguintes procedimentos, a fim de obter óptimos resultados:

1. Para cada indivíduo, recolha 1mL de sangue por venipunctura directamente para dentro de cada um dos tubos de colheita de sangue QuantiFERON®-TB Gold IT.
  - Em locais até 810 metros de altura, devem ser usados os tubos de colheita de sangue QuantiFERON® Standard. Em locais acima dos 1020 metros, devem ser usados os tubos de colheita de sangue QuantiFERON® para altitudes elevadas (HA).

*Se usar tubos de colheita de sangue QuantiFERON® fora de estas alturas, ou no caso de baixos volumes de sangue, também pode extrair o sangue usando uma seringa e transferindo 1 mL de sangue a cada um dos três tubos. Por motivos de segurança, é aconselhável remover a agulha da seringa, tomando as precauções devidas, tirar as tampas dos três tubos QFT-Gold IT e adicionar 1 mL de sangue a cada um dos tubos (marcação preta no lado do rótulo do tubo). Coloque as tampas novamente e misture como descrito abaixo.*

- Como os tubos de 1mL extraem o sangue relativamente devagar, mantenha o tubo na agulha durante mais 2-3 segundos depois de o tubo parecer estar cheio, para assim garantir que é retirado o volume necessário.

*A marcação preta no lado dos tubos indica o volume de enchimento de 1mL. Os tubos para colheita de sangue QuantiFERON®-TB Gold foram validados para volumes entre 0,8 e 1,2mL. Se o nível do sangue em algum dos tubos não se aproximar da linha indicadora, é recomendável obter outra amostra de sangue.*

- Se estiver a usar uma agulha de borboleta para colheita do sangue, deve ser usado um tubo de purga para garantir que a tubagem está cheia de sangue antes de serem usados os tubos QuantiFERON®-TB Gold.

2. Misture os tubos **agitando-os vigorosamente durante 5 segundos** (ou 10 vezes) para assegurar que **toda a superfície interna do tubo ficou revestida de sangue**.

- É necessária uma mistura profunda para garantir a integração total do conteúdo do tubo no sangue.
- É de esperar a formação de espuma do sangue durante o processo de agitação, contudo isso não afecta a performance da análise e não deve constituir uma preocupação para o técnico.

3. Rotule os tubos adequadamente.

- Assegure-se de que cada tubo (o nulo, o de antígeno da TB e o do agente mitogénico) é identificável, pelo seu rótulo ou de qualquer outro modo, depois de se retirar a tampa.

4. Os tubos devem ser transferidos para uma incubadora a 37°C o mais rapidamente possível, no espaço de 16 horas a contar da colheita. Não refrigere nem congele as amostras de sangue.

## 6. INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

### Fase um – Incubação de sangue e colheita de plasma

#### Materiais fornecidos

Tubos de colheita de sangue QuantiFERON®-TB Gold IT (consulte a secção 3).

#### Materiais necessários (mas não fornecidos)

Consulte a secção 3.

#### Procedimento

1. Se o sangue não for incubado logo após a colheita, a **mistura dos tubos deve ser repetida imediatamente antes da incubação**, como descrito na secção 5.
2. Incube os tubos **NA VERTICAL** a 37°C, durante 16 a 24 horas. A incubadora não necessita de CO<sub>2</sub> nem de humedificação.
3. Após a incubação a 37°C, os tubos de colheita de sangue podem ser mantidos entre 2°C e 27°C durante 3 dias antes de serem submetidos a centrifugação.
4. Após a incubação dos tubos a 37°C, a colheita de plasma é facilitada centrifugando os tubos durante 15 minutos entre 2000 a 3000 de RCF (g). O tampão de gel separará as células do plasma. Caso isso não ocorra, os tubos devem voltar a ser centrifugados a uma velocidade mais elevada.
  - É possível colher o plasma sem centrifugação, contudo é necessário um cuidado especial para retirar o plasma sem perturbar as células.
5. As amostras de plasma podem ser carregadas directamente dos tubos de colheita de sangue para a placa ELISA de QuantiFERON®-TB Gold, especialmente quando estiverem a ser usadas estações de trabalho automatizadas ELISA.
6. Em alternativa, as amostras de plasma podem ser conservadas antes de submetidas ao ELISA, quer seja nos tubos centrifugados ou recolhidas em contentores de armazenamento de plasma. Por exemplo, recolha >150µL de plasma para dentro dos poços de microplacas ou microtubos em armação no formato de 96 poços e sele para evitar derramar e evaporar, caso as amostras sejam para conservar.
  - As amostras de plasma podem ser conservadas até 4 semanas entre 2°C e 8°C ou abaixo de –20°C (de preferência menos de –70°C) por períodos prolongados.

## **Fase dois – Interferão- $\gamma$ humano ELISA**

### **Materiais fornecidos**

Kit ELISA QuantiFERON®-TB Gold (consulte a secção 3).

### **Materiais necessários (mas não fornecidos)**

Consulte a secção 3.

### **Procedimento**

1. Todas as amostras de plasma e reagentes, à excepção do Conjugado 100X Concentrado, têm de ser trazidos à temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) antes de usados. Deixe decorrer pelo menos 60 minutos para o efeito.
2. Retire as fitas desnecessárias da estrutura, volte a selá-las com a película e volte a conservar no frio até que sejam precisas.

Destine pelo menos uma fita para os Standards QuantiFERON®-TB Gold e fitas suficientes para o número de indivíduos a testar (consulte as figuras 2A & 2B sobre os formatos de 2 e 3 tubos, respectivamente). Depois de utilizar, guarde a estrutura e a tampa para as fitas restantes.

3. Reconstitua o Kit Standard liofilizado com o volume de água desionizada ou destilada indicada no rótulo do frasco Standard. Misture cuidadosamente para minimizar a formação de espuma e garantir a dissolução completa. A reconstituição do Standard ao volume indicado produzirá uma solução com uma concentração de 8,0 UI/mL.

*Nota: O volume de reconstituição do Kit Standard apresenta diferenças entre lotes.*

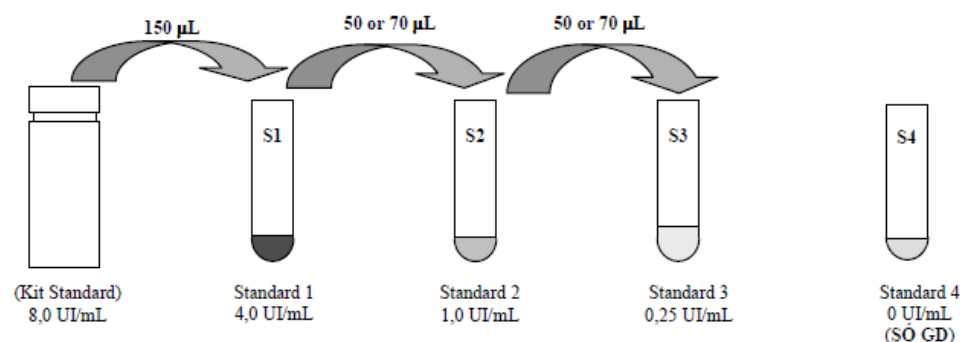
Use o Kit Standard reconstituído numa série de diluição de 1:4 de IFN- $\gamma$  em Diluente Verde (GD) – consulte a figura 1. S1 (Standard 1) contém 4 UI/mL, S2 (Standard 2) contém 1 UI/mL, S3 (Standard 3) contém 0,25 UI/mL e S4 (Standard 4) contém 0 UI/mL (só GD). Os Standards devem ser analisados pelo menos em duplicado.

#### **PROCEDIMENTO RECOMENDADO PARA STANDARDS DUPLICADOS**

- a. Rotule 4 tubos “S1”, “S2”, “S3” e “S4”.
- b. Adicione 150 $\mu\text{L}$  de GD ao S1, S2, S3 e S4.
- c. Adicione 150 $\mu\text{L}$  do Kit Standard ao S1 e misture totalmente.
- d. Transfira 50 $\mu\text{L}$  de S1 para S2 e misture totalmente.
- e. Transfira 50 $\mu\text{L}$  de S2 para S3 e misture totalmente.
- f. Só GD serve de Standard nulo (S4).

#### **PROCEDIMENTO RECOMENDADO PARA STANDARDS TRIPLICADOS**

- a. Rotule 4 tubos “S1”, “S2”, “S3” e “S4”.
- b. Adicione 150 $\mu\text{L}$  de GD ao S1.
- c. Adicione 210 $\mu\text{L}$  de GD ao S2, S3 e S4.
- d. Adicione 150 $\mu\text{L}$  do Kit Standard ao S1 e misture totalmente.
- e. Transfira 70 $\mu\text{L}$  de S1 para S2 e misture totalmente.
- f. Transfira 70 $\mu\text{L}$  de S2 para S3 e misture totalmente.
- g. Só GD serve de Standard nulo (S4).

**FIGURA 1. Preparação da curva standard**


- Prepare diluições novas do Kit Standard para cada sessão ELISA.

4. Reconstitua Conjugado 100X Concentrado liofilizado com 0,3mL de água desionizada ou destilada. Misture cuidadosamente para minimizar a formação de espuma e **garantir a dissolução completa do conjugado**.

O conjugado pronto a usar é preparado diluindo a quantidade necessária de Conjugado 100X Concentrado reconstituído em Diluente Verde, como descrito no quadro 1 – Preparado de Conjugado.

**QUADRO 1. Preparado de Conjugado**

NÚMERO DE FITAS	VOLUME DE CONJUGADO 100X CONCENTRADO	VOLUME DE DILUENTE VERDE
2	10 µL	1,0 mL
3	15 µL	1,5 mL
4	20 µL	2,0 mL
5	25 µL	2,5 mL
6	30 µL	3,0 mL
7	35 µL	3,5 mL
8	40 µL	4,0 mL
9	45 µL	4,5 mL
10	50 µL	5,0 mL
11	55 µL	5,5 mL
12	60 µL	6,0 mL

- Misture total mas cuidadosamente para evitar a formação de espuma.
  - Volte a refrigerar Conjugado 100X Concentrado não necessário entre 2°C e 8°C imediatamente após o uso.
  - Use apenas Diluente Verde.
5. Antes da análise, os plasmas devem ser misturados para garantir que o IFN-γ é distribuído homogeneamente pela amostra.
  6. Adicione 50µL de conjugado acabado de preparar e pronto a usar aos poços ELISA, usando uma pipeta multicanal.

7. Adicione 50µL de amostras de plasma para teste aos poços adequadas, usando uma pipeta multicanal (consulte o esquema seguinte recomendado para a distribuição das placas – figuras 2A & 2B). Finalmente, adicione 50µL a cada um dos Standards 1 a 4.

**FIGURA 2A. Esquema recomendado de amostras para o tubo nulo & o de antígeno da TB (44 testes por placa)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	5N	9N	13N	17N	S1	S1	25N	29N	33N	37N	41N
B	1A	5A	9A	13A	17A	S2	S2	25A	29A	33A	37A	41A
C	2N	6N	10N	14N	18N	S3	S3	26N	30N	34N	38N	42N
D	2A	6A	10A	14A	18A	S4	S4	26A	30A	34A	38A	42A
E	3N	7N	11N	15N	19N	21N	23N	27N	31N	35N	39N	43N
F	3A	7A	11A	15A	19A	21A	23A	27A	31A	35A	39A	43A
G	4N	8N	12N	16N	20N	22N	24N	28N	32N	36N	40N	44N
H	4A	8A	12A	16A	20A	22A	24A	28A	32A	36A	40A	44A

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Amostra 1. Plasma de controlo nulo); 1A (Amostra 1. Plasma de antígeno da TB).

**FIGURA 2B. Esquema recomendado de amostras para o tubo nulo, o de antígeno da TB & de agente mitogénico (28 testes por placa)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1M	S1	S1	S1	13N	13A	13M	21N	21A	21M
B	2N	2A	2M	S2	S2	S2	14N	14A	14M	22N	22A	22M
C	3N	3A	3M	S3	S3	S3	15N	15A	15M	23N	23A	23M
D	4N	4A	4M	S4	S4	S4	16N	16A	16M	24N	24A	24M
E	5N	5A	5M	9N	9A	9M	17N	17A	17M	25N	25A	25M
F	6N	6A	6M	10N	10A	10M	18N	18A	18M	26N	26A	26M
G	7N	7A	7M	11N	11A	11M	19N	19A	19M	27N	27A	27M
H	8N	8A	8M	12N	12A	12M	20N	20A	20M	28N	28A	28M

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Amostra 1. Plasma de controlo nulo); 1A (Amostra 1. Plasma de antígeno de TB); 1M (Amostra 1. Plasma de controlo do agente mitogénico).

8. Misture totalmente o conjugado e as amostras de plasma/standards, usando um agitador de microplacas durante 1 minuto.
9. Cubra cada placa com uma tampa e incube à temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) durante  $120 \pm 5$  minutos.

- As placas não devem ser expostas a luz solar directa durante a incubação.

10. Durante a incubação, dilua uma parte de tampão de lavagem 20X Concentrado com 19 partes de água desionizada ou destilada e misture totalmente. Foi fornecido Tampão de Lavagem 20X Concentrado suficiente para preparar 2L de tampão de lavagem pronto a usar.

Lave os poços com **400µL** de tampão de lavagem pronto a usar durante, pelo menos por 6 ciclos. Recomenda-se a utilização de um lavador automático de placas.

- A lavagem profunda é muito importante para a performance da análise. Assegure-se de que, para cada ciclo de lavagem, cada poço está completamente cheio de tampão de lavagem até ao cimo. Recomenda-se um período de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo.
- Deve ser adicionado ao reservatório efluente desinfetante normal de laboratório, assim como devem ser seguidos os procedimentos estabelecidos para a descontaminação de material potencialmente infeccioso.



11. Bata com as placas com os poços virados para baixo sobre um papel absorvente para retirar tampão de lavagem residual. Adicione 100µL de Solução de Substrato Enzimático a cada poço e misture totalmente usando um agitador de microplacas.
12. Cubra cada placa com uma tampa e incube à temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 minutos.
  - As placas não devem ser expostas a luz solar directa durante a incubação.
13. A seguir à incubação de 30 minutos, adicione 50µL de Solução de Paragem Enzimática a cada poço e misture.
  - A Solução de Paragem Enzimática deve ser adicionada aos poços pela mesma ordem e, aproximadamente, à mesma velocidade do substrato no passo 11.
14. Meça a Densidade Óptica (DÓ) de cada poço no espaço de 5 minutos após adição da solução de paragem, usando um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450nm e com um filtro de referência de 620nm a 650nm. Os valores de DÓ são usados para calcular resultados.

## 7. CÁLCULOS E INTERPRETAÇÃO DO TESTE

A Cellestis tem disponível o programa QuantiFERON®-TB Gold IT Analysis Software, usado para analisar dados em bruto e calcular os resultados.

O software executa uma avaliação de Controlo da Qualidade da análise, gera uma curva standard e fornece um resultado do teste para cada indivíduo, como explicado ao pormenor na secção de Interpretação de Resultados.

Como alternativa ao QuantiFERON®-TB Gold IT Analysis Software, os resultados podem ser determinados de acordo com o método seguinte:

### Geração da curva standard

*(se não for usado o QuantiFERON®-TB Gold IT Analysis Software)*

Determine os valores médios de DÓ das réplicas do Kit Standard em cada placa.

Construa uma curva standard  $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$  traçando o  $\log_{(e)}$  da DÓ média (eixo y) contra o  $\log_{(e)}$  da concentração de IFN- $\gamma$  dos standards em UI/mL (eixo x), omitindo o standard zero destes cálculos. Calcule a linha que melhor assenta à curva standard por análise de regressão.

Use a curva standard para determinar a concentração de IFN- $\gamma$  (UI/mL) para cada uma das amostras de plasma a testar, usando o valor de DÓ para cada amostra.

Estes cálculos podem ser efectuados usando software disponível com leitores de microplacas e folhas de cálculo comuns ou software para estatística (como o Microsoft Excel). Recomenda-se que esse tipo de software seja usado para calcular a análise de regressão, o coeficiente de variação (%CV) para os standards e o coeficiente de correlação (r) da curva standard.

### Controlo da Qualidade do Teste

A precisão dos resultados do teste depende da geração de uma curva standard exacta. Assim sendo, os resultados derivados dos standards têm de ser examinados antes de os resultados das amostras de teste poderem ser interpretados.

Para o ELISA ser válido:

- O valor médio de DÓ para o Standard 1 tem de ser  $\geq 0,600$ .
- O %CV dos valores de DÓ replicados do Standard 1 e Standard 2 tem de ser  $\leq 15\%$ .
- Os valores DÓ replicados para o Standard 3 e Standard 4 não podem divergir mais do que 0,040 de unidades de DÓ do seu valor médio.
- O coeficiente de correlação (r) calculado a partir dos valores médios de absorvância dos standards tem de ser de  $\geq 0,98$ .

O QuantiFERON®-TB Gold Analysis Software calcula e regista estes parâmetros de controlo da qualidade.

Se os critérios acima indicados não forem satisfeitos, o teste é considerado inválido e tem de ser repetido.

- O valor médio de DÓ para o Standard Zero (Diluyente Verde) tem de ser  $\leq 0,150$ . Se o valor médio de DÓ for  $> 0,150$ , há que investigar o procedimento de lavagem da placa.

### Interpretação dos resultados

Os resultados de QuantiFERON®-TB Gold IT são interpretados usando os seguintes critérios:

**NOTA:** Diagnosticar ou excluir a tuberculose doença e avaliar a probabilidade da LTBI exige uma combinação das conclusões retiradas da avaliação epidemiológica, histórica, médica e de diagnóstico que deverão ser levadas em conta ao interpretar os resultados de QuantiFERON®-TB Gold IT.

**CASO SEJAM USADOS APENAS TUBOS NULOS & DE ANTIGÉNIO DA TB**

Nulo [UI/mL]	Antigénio da TB menos nulo [UI/mL]	QuantiFERON®-TB [UI/mL]	Relatório/Interpretação
$\leq 8,0$	$< 0,35$	Negativo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> NÃO provável
	$\geq 0,35$ e $< 25\%$ do valor do nulo		
	$\geq 0,35$ e $\geq 25\%$ do valor do nulo	Positivo <sup>1</sup>	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> provável
$> 8,0$ <sup>2</sup>	Qualquer um	Inconclusivo <sup>3</sup>	Resultados são inconclusivos quanto à resposta ao antigénio da TB

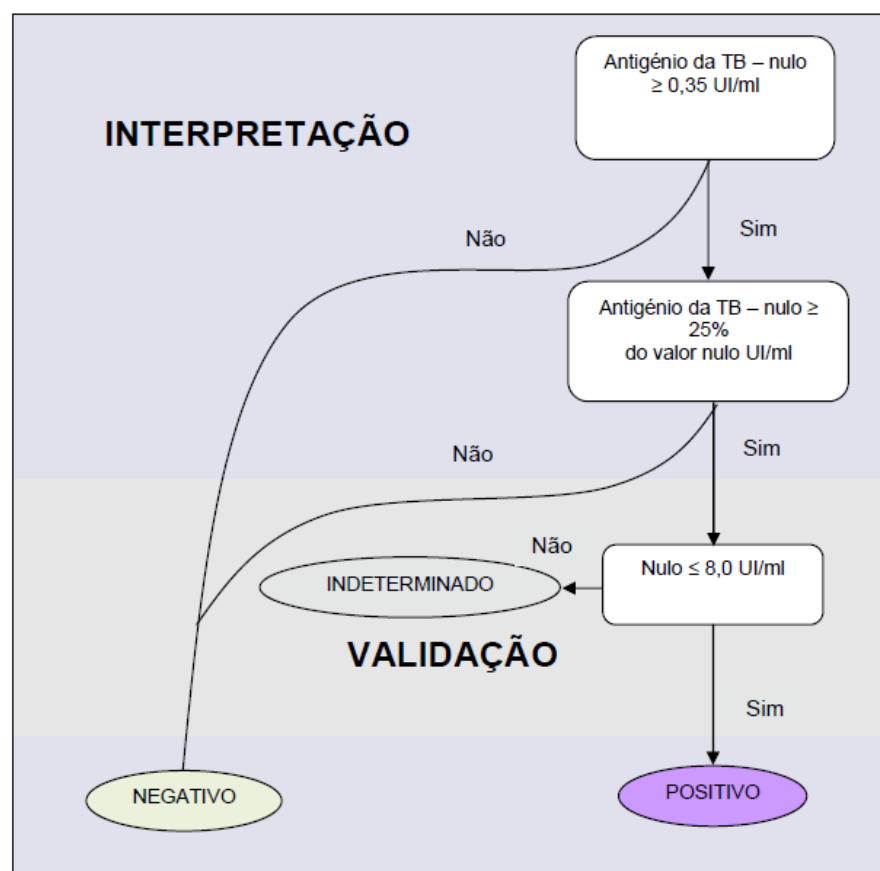
<sup>1</sup> Nos casos em que não se suspeita de infecção por *M. tuberculosis*, resultados inicialmente positivos podem ser confirmados por novo teste às amostras originais de plasma em duplicado no QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Se o teste repetido de uma ou das duas réplicas for positivo, o teste do indivíduo deve ser considerado positivo.

<sup>2</sup> Em estudos clínicos, menos de 0,25% dos sujeitos apresentaram níveis de IFN- $\gamma$   $> 8,0$  UI/mL para o controlo nulo.

<sup>3</sup> Consulte a secção de Resolução de problemas para aferir possíveis causas.

A magnitude do nível de IFN- $\gamma$  medido não pode ser correlacionada com o estágio nem o grau de infecção, com o nível de resposta imunitária nem com a probabilidade de progressão para doença activa.

FIGURA 3. Fluxograma para interpretação CASO sejam usados tubos de NULO & DE ANTIGÊNIO DA TB





**CASO SEJAM USADOS TUBOS DE NULO, DE ANTIGÊNIO DA TB E DE AGENTE MITOGENICO**

Nulo [UI/mL]	Antigénio da TB menos nulo [UI/mL]	Agente mitogénico menos nulo [UI/mL] <sup>1</sup>	QuantiFERON®-TB [UI/mL]	Relatório/Interpretação
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativo	<i>Infecção por M. tuberculosis</i> NÃO provável
	≥ 0,35 e < 25% do valor do nulo	≥ 0,5		
	≥ 0,35 e ≥ 25% do valor do nulo	Qualquer um	Positivo <sup>2</sup>	<i>Infecção por M. tuberculosis</i> provável
	< 0,35	< 0,5	Inconclusivo <sup>3</sup>	Resultados são inconclusivos quanto à resposta ao antigénio da TB
	≥ 0,35 e < 25% do valor do nulo	< 0,5		
> 8,0 <sup>4</sup>	Qualquer um	Qualquer um		

<sup>1</sup> As respostas ao controlo positivo de agente mitogénico (e ocasionalmente de antigénio da TB) situam-se frequentemente fora da amplitude do leitor de microplacas. Isso não tem qualquer impacto nos resultados do teste.

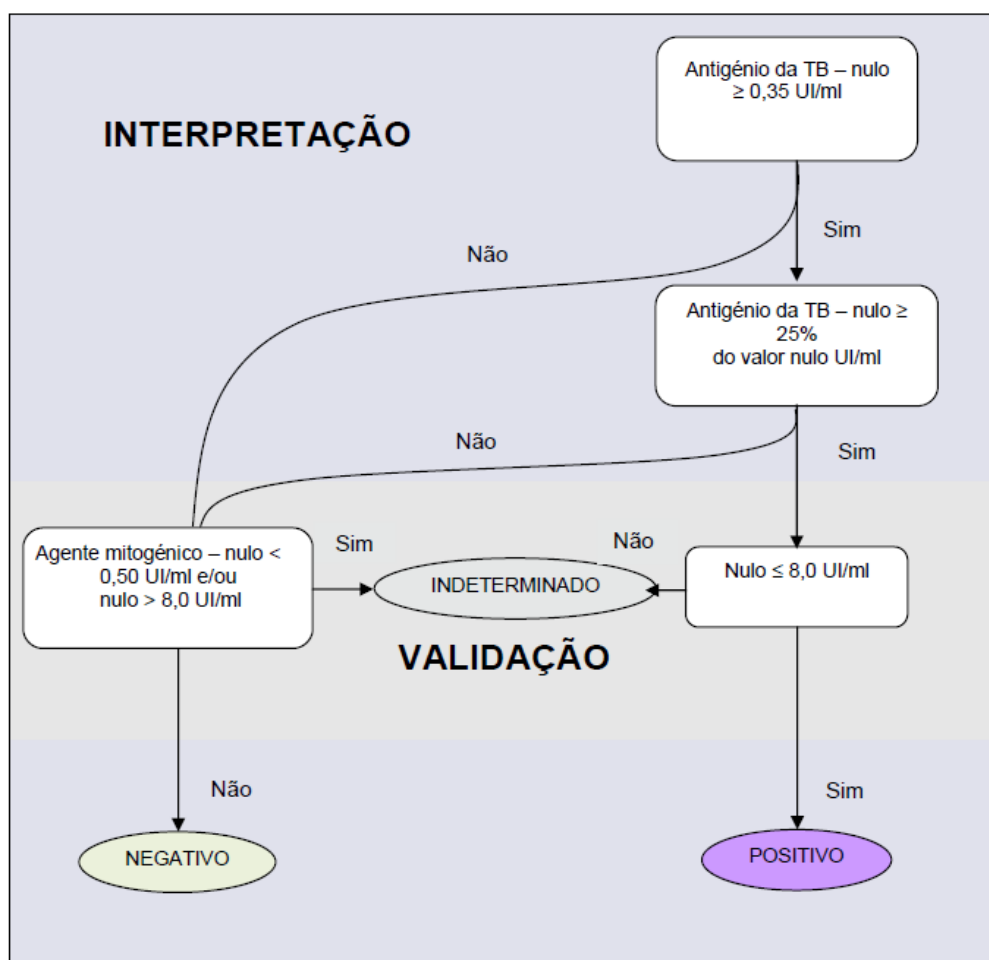
<sup>2</sup> Nos casos em que não se suspeita de infecção por *M. tuberculosis*, resultados inicialmente positivos podem ser confirmados por novo teste às amostras originais de plasma em duplicado no QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Se o teste repetido de uma ou das duas réplicas for positivo, o teste do indivíduo deve ser considerado positivo.

<sup>3</sup> Consulte a secção de Resolução de problemas para aferir possíveis causas.

<sup>4</sup> Em estudos clínicos, menos de 0,25% dos sujeitos apresentaram níveis de IFN-γ > 8,0 UI/mL para o controlo nulo.

A magnitude do nível de IFN-γ medido não pode ser correlacionada com o estágio nem grau de infecção, com o nível de resposta imunitária nem com a probabilidade de progressão para doença activa.

**FIGURA 4. Fluxograma para interpretação CASO sejam usados tubos de NULO, DE ANTIGÊNIO DA TB E DE AGENTE MITOGENICO**



## 8. LIMITAÇÕES

Os resultados do teste com QuantiFERON®-TB Gold IT têm de ser usados em conjunto com o historial epidemiológico de cada indivíduo, com o seu estado actual e com outras avaliações de diagnóstico.

Resultados com valores de nulo superiores a 8 UI/mL são classificados de "inconclusivos" porque uma resposta 25% superior aos antígenos da TB poderá situar-se fora da amplitude de medição da análise.

Podem ocorrer resultados não fiáveis ou inconclusivos devido a:

- desvios do procedimento descrito no Folheto Informativo,
- níveis excessivos de IFN- $\gamma$  em circulação ou presença de anticorpos heterófilos,
- mais de 16 horas entre a colheita da amostra de sangue e a incubação a 37°C.

## 9. CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

### Estudos clínicos

Como não existe um padrão definitivo para a infecção latente de tuberculose (LTBI), na prática não pode ser feita uma estimativa à sensibilidade e à especificidade quanto a QuantiFERON®-TB Gold IT. A especificidade de QuantiFERON®-TB Gold IT foi aproximada avaliando falsos-positivos em pessoas de baixo risco (sem factores de risco conhecidos) de infecção com tuberculose. A sensibilidade foi aproximada avaliando grupos de pacientes com TB doença activa confirmada por cultura.

#### Especificidade

Num estudo norte-americano envolvendo 866 voluntários, foi retirado sangue para QuantiFERON®-TB Gold IT quando foi efectuado um TST. A informação demográfica e os factores de risco relativamente à TB foram determinados usando um inquérito standard na altura do teste. De 432 voluntários sem factores de risco conhecidos de infecção por *M. tuberculosis*, estiveram disponíveis resultados de QuantiFERON®-TB Gold IT e TST para 391. Nenhum deles havia sido vacinado com BCG. Foi realizado um segundo estudo de especificidade com QuantiFERON®-TB Gold IT em indivíduos de baixo risco no Japão, aproximadamente 90 % dos quais haviam sido vacinados com BCG. O quadro 2 apresenta os resultados de ambos os estudos de especificidade.

**Quadro 2. Especificidade de QuantiFERON®-TB Gold IT: resultados para pessoas sem risco relatado de infecção por *M. tuberculosis*.**

ESTUDO	Percentagem de vacinados com BCG	Total testado	N.º QFT-G inconclusivo	N.º QFT-G positivo / n.º testes válidos	Especificidade de QFT-G (95% CI)	N.º TST positivo / n.º testados	Especificidade de TST* (95% CI)
EUA (não publicado)	0%	391	1	3 / 390	99,2% (97,6-99,8)	6 / 391	98,5% (96,5-99,4)
Japão (não publicado)	~90%	190	4	3 / 186	98,4% (95-99,6)	-	-
TOTAL		581	5/584 (0,9%)	6 / 576	99,0%	-	-

\*Usando *cut off* de TST de 10mm. A estimativa da especificidade de TST é de 99,1% ao usar um *cut off* de 15mm.

#### Sensibilidade à TB activa

A fim de avaliar a sensibilidade de QuantiFERON®-TB Gold IT, foram testados suspeitos de infecção da TB da Austrália e do Japão, os quais confirmaram subsequentemente a infecção por *M. tuberculosis* por cultura. Enquanto não existe um teste padrão definitivo para a infecção latente da tuberculose (LTBI), um substituto adequado é a cultura microbiológica de *M. tuberculosis*, visto que os pacientes com a doença estão, por definição, infectados. Os pacientes haviam recebido menos de 8 dias de tratamento, antes da colheita de sangue para o teste de QuantiFERON®-TB Gold IT.

O quadro 3 resume as conclusões dos dois grupos de pacientes positivos na cultura de *M. tuberculosis*. A sensibilidade geral de QuantiFERON®-TB Gold IT para a TB doença foi de 89% (48/54).

**Quadro 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: Indivíduos com infecção de *M. tuberculosis* confirmada por cultura.**

ESTUDO		Doença confirmada por	N.º QFT-Gold positivo / n.º testes válidos	Sensibilidade QFT-Gold (95% CI)
Estudo de validação de pacientes de TB do Japão		Cultura	24 / 27	89% (72-96%)
Estudo de validação de pacientes de TB da Austrália	Pulmonar	Cultura	7 / 10	70% (40-89%)
	Extra-pulmonar		17 / 17	100% (82-100%)
TOTAL			48 / 54	89% (78-95%)

#### Diagnóstico da LTBI

Foi publicado um número de estudos que demonstram a performance de QuantiFERON®-TB Gold IT em várias populações em risco de contrair LTBI. O quadro 4 apresenta as conclusões primárias de alguns estudos seleccionados.

**Quadro 4. Estudos publicados seleccionados sobre QuantiFERON®-TB Gold IT em populações em risco de contrair LTBI.**

ESTUDO	Total testado	Resultados e conclusões
Prestadores de cuidados de saúde na Índia (Pai <i>et al</i> 2005) <sup>26</sup>	726	Cenário de taxas de TB muito elevadas. 40% de QFT-Gold IT positivos cf. 41% TST positivos a 10mm. Elevada concordância com TST, sem efeito do BCG em nenhum dos lados. Ambos os testes relacionados com os factores de risco "idade" e "período de trabalho na prestação de cuidados de saúde"
Portadores do VIH na Dinamarca (Brock <i>et al</i> 2006) <sup>7</sup>	590	A prevalência geral de LTBI por QFT-Gold IT foi de 4,6% (27/590) em portadores de VIH. Resultados positivos foram associados aos riscos da TB. Dois indivíduos positivos por QFT-Gold IT evoluíram para TB activa no espaço de um ano. Respostas inconclusivas (n=20, 3,4%) foram associadas significativamente à contagem de CD4 <100 / µL
Crianças hospitalizadas (Dogra <i>et al</i> 2006) <sup>12</sup>	105	Crianças com suspeita de TB ou com história de contacto com TB foram testadas com QFT-Gold IT e TST. 10,5% de QFT-Gold IT positivos cf. 9,5% TST positivos a 10mm. A concordância entre os testes foi de 95,2% em geral e de 100% em indivíduos não vacinados com BCG.
Contactos alemães (Diel <i>et al</i> 2006) <sup>11</sup>	309	Foram testados contactos estreitos de 15 casos índices diferentes. 51% estavam vacinados com o BCG, 27% nascido no estrangeiro. 70% dos vacinados com BCG e 18% dos não vacinados eram positivos ao TST (5mm), ao passo que 9% e 11% eram positivos a QFT-Gold IT, respectivamente. QFT-Gold IT foi associado ao risco de TB. TST só foi associado à vacinação com BCG.

Muitas mais publicações descrevem a performance da versão do antígeno líquido menos sensível de QuantiFERON®-TB Gold (o precursor de QuantiFERON®-TB Gold IT) e do teste QuantiFERON®-TB Gold IT. Estes estudos incluem a utilização do(s) teste(s) em contactos de casos de TB activa<sup>9,11, 19, 25</sup>, crianças<sup>6-10, 25, 28</sup>, portadores do VIH<sup>2, 5, 20</sup>, prestadores de cuidados de saúde<sup>13, 26, 32</sup>, indivíduos imunossuprimidos<sup>3, 4, 22, 23, 27, 30, 31</sup>, bem como suspeitos de TB<sup>7, 8, 10, 18</sup> e indivíduos de baixo risco<sup>15</sup>.

#### Repetibilidade e efeito do TST em testes subsequentes com QuantiFERON®-TB Gold

Como parte do estudo de especificidade norte-americano, um sub-conjunto dos voluntários voltou a ser testado 4 a 5 semanas após o teste original com QuantiFERON®-TB Gold IT e com TST. Os resultados com QuantiFERON®-TB Gold IT para 260 recrutados estiveram disponíveis em ambas as alturas e o nível de concordância foi de 99,6% (259/260). Um TST anterior não induziu respostas positivas do QuantiFERON®-TB Gold IT.

## 10. INFORMAÇÃO TÉCNICA

### Resultados inconclusivos

Resultados inconclusivos deviam ser raros e podem ser o estado de imunidade do indivíduo a ser testado, embora possam também estar relacionados com um número de factores técnicos:

- mais de 16 horas entre a colheita de sangue e a incubação a 37°C
- armazenamento do sangue fora da amplitude térmica recomendada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ )
- mistura insuficiente dos tubos para colheita de sangue
- lavagem incompleta da placa ELISA

Se houver suspeitas sobre a técnica de colheita ou manuseamento das amostras de sangue, repita o teste completo de QuantiFERON®-TB Gold IT com uma nova amostra de sangue. O teste ELISA de plasmas estimulados poderá ser repetido em caso de suspeita de lavagem inadequada ou de outro desvio do procedimento com o teste ELISA. Não seria de esperar que testes inconclusivos que resultem de valores reduzidos de agente mitogénico ou de valores elevados do nulo se alterem na repetição, a não ser que haja um erro no teste ELISA. Resultados inconclusivos devem ser relatados como tal. O médico pode escolher entre recolher outra amostra ou efectuar outros procedimentos, conforme seja conveniente.

### Amostra de plasma coagulado

Se ocorrerem coágulos de fibrina com amostras de plasma armazenadas durante um longo período, centrifugue as amostras para sedimentar o material coagulado e facilitar a pipetagem do plasma.

### Resolução de problemas ELISA

#### *Desenvolvimento cromático não-específico*

POSSÍVEL CAUSA	SOLUÇÃO
Lavagem incompleta da placa.	Lave a placa pelo menos 6 vezes com 400µL/poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, dependendo do lavador usado. Deve respeitar-se um período de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo.
Contaminação cruzada de poços ELISA.	Cuidado ao pipetar e misturar a amostra, a fim de minimizar o risco.
Data de validade do kit / componentes expirou.	Assegure-se de que o kit usado está dentro da validade. Assegure-se de que o Standard e o Conjugado 100X Concentrado reconstituídos são usados no espaço de três meses a contar da data de reconstituição.
Solução de Substrato Enzimático está contaminada.	Ponha de parte o substrato se apresentar coloração azul. Assegure-se de que são usados reservatórios limpos para os reagentes.

#### *Leituras de baixa Densidade Óptica para Standards*

POSSÍVEL CAUSA	SOLUÇÃO
Erro de diluição do Standard.	Assegure-se de que as diluições do Kit Standard são preparadas correctamente, conforme o Folheto Informativo.
Erro de pipetagem.	Assegure-se de que as pipetas são calibradas e usadas de acordo com as instruções do fabricante.
Temperatura de incubação demasiado baixa.	A incubação do ELISA deve ser feita à temperatura ambiente, entre 17°C e 27°C.
Tempo de incubação demasiado curto.	A incubação da placa com o conjugado, standards e amostras deve durar 120 ± 5 minutos. A Solução de Substrato Enzimático é incubada na placa durante 30 minutos.
Usado um filtro incorrecto do leitor de placas.	A placa deve ser lida a 450nm, com um filtro de referência entre 620 e 650nm.
Reagentes estão demasiado frios.	Todos os reagentes, à excepção do Conjugado 100X Concentrado, têm de ser trazidos à temperatura ambiente antes de iniciar a análise. Isso leva aproximadamente uma hora.
Data de validade do kit / componentes expirou.	Assegure-se de que o kit usado está dentro da validade. Assegure-se de que o Standard e o Conjugado 100X Concentrado reconstituídos são usados no espaço de três meses a contar da data de reconstituição.



*Fundo de cor intensa*

POSSÍVEL CAUSA	SOLUÇÃO
Lavagem incompleta da placa.	Lave a placa pelo menos 6 vezes com 400µL/poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, dependendo do lavador usado. Deve respeitar-se um período de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo.
Temperatura de incubação demasiado elevada.	A incubação do ELISA deve ser feita à temperatura ambiente, entre 17°C e 27°C.
Data de validade do kit / componentes expirou.	Assegure-se de que o kit usado está dentro da validade. Assegure-se de que o Standard e o Conjugado 100X Concentrado reconstituídos são usados no espaço de três meses a contar da data de reconstituição.
Solução de Substrato Enzimático está contaminada.	Ponha de parte o substrato se apresentar coloração azul. Assegure-se de que são usados reservatórios limpos para os reagentes.

*Curva standard não-linear e variabilidade entre as amostras duplas*

POSSÍVEL CAUSA	<u>SOLUÇÃO</u>
Lavagem incompleta da placa.	Lave a placa pelo menos 6 vezes com 400µL/poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, dependendo do lavador usado. Deve respeitar-se um período de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo.
Erro de diluição do Standard.	Assegure-se de que as diluições do Standard são preparadas correctamente, conforme o Folheto Informativo.
Mistura mal feita.	Misture os reagentes totalmente por inversão ou por turbilhão antes de os adicionar à placa.
Técnica inconsistente de pipetagem ou interrupção durante a configuração da análise.	A adição de amostras e de Standard deve ser feita de forma contínua. Todos os reagentes devem ser preparados antes de começar a análise.

Um vídeo sobre o procedimento durante a análise e sobre a solução para a maioria dos problemas técnicos encontra-se no CD de Informação sobre o Produto e Guia Técnica, disponível gratuitamente junto da Cellestis ou através do seu distribuidor.

## 11. BIBLIOGRAFIA

A comprehensive list of QuantiFERON®-TB Gold references is located on the Cellestis website ([www.cellestis.com](http://www.cellestis.com))

1. Andersen, P., *et al.* Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000. 356; 1099-104.
2. Balcells, M.E., *et al.* A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int J Infect Dis.* 2008. 12; 645-52.
3. Bartalesi, F., *et al.* QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur Respir J.* 2008. [Epub ahead of print].
4. Bocchino, M., *et al.* Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008. 27; 907-13.
5. Brock, I., *et al.* Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir Res.* 2006. 7; 56.
6. Chun, J.K., *et al.* The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008. [Epub ahead of print].
7. Connell, T.G., *et al.* A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 2008. 3; e2624.
8. Detjen, A.K., *et al.* Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2007. 45; 322-8.
9. Diel, R., *et al.* Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest.* 2008. [Epub ahead of print].
10. Diel, R., *et al.* Predictive value of a whole-blood IFN- $\gamma$  assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008. 177; 1164-70.
11. Diel, R., *et al.* Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006. 7; 77.
12. Dogra, S., *et al.* Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect.* 2007. 54; 267-76.
13. Drobniewski, F., *et al.* Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 2007. 4; e55.
14. Gerogianni, I., *et al.* Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology.* 2008. 13; 270-4.
15. Harada, N., *et al.* Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect.* 2008. 56; 348-53.
16. Higuchi, K., *et al.* Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol.* 2008. [Epub ahead of print].
17. Kang, Y.A., *et al.* Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA.* 2005. 293; 2756-61.
18. Katiyar, S. K., *et al.* Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 1146-52.
19. Kipfer, B., *et al.* Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss Med Wkly.* 2008. 138; 267-72.
20. Luetkemeyer, A., *et al.* Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007. 175; 737-42.
21. Mackensen, F., *et al.* QuantiFERON-TB Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am J Ophthalmol.* 2008. 146; 761-6.



- ## 12. ASSISTÊNCIA TÉCNICA

Cellestis GmbH:  
(Europa)  
Telephone: +49 6151 428 59 - 0  
Fax: +49 6151 428 59 - 110  
E-mail: [europe@cellestis.com](mailto:europe@cellestis.com)

### 13. PROCEDIMENTO ABREVIADO DO TESTE

#### FASE 1 – INCUBAÇÃO DO SANGUE

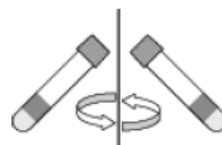
1. Recolha o sangue do paciente para dentro dos tubos para colheita de sangue e misture-o, **agitando os tubos vigorosamente durante 5 segundos (ou 10 vezes)**, para assegurar que **toda a superfície interna do tubo** ficou revestida com sangue.



2. Incube os tubos **na vertical** a 37°C, durante 16 a 24 horas.



3. A seguir à incubação, centrifugue os tubos durante 5 a 15 minutos, entre 2000 e 3000g RCF (g), para separar o plasma dos glóbulos vermelhos.



4. A seguir à centrifugação, recolha uma amostra de plasma de cada tubo para quantificação de IFN- $\gamma$ .



# FASE 2 – IFN- $\gamma$ ELISA

1. Deixe os componentes ELISA, à exceção do Conjugado 100X Concentrado, atingirem a temperatura ambiente durante, pelo menos, 60 minutos.

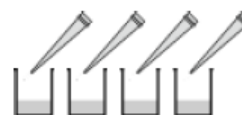


2. Reconstitua o Kit Standard a 8,0 UI/mL com água destilada ou desionizada. Prepare quatro (4) diluições standard.

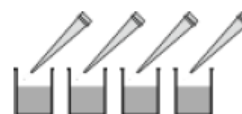


3. Reconstitua Conjugado 100X Concentrado liofilizado com água destilada ou desionizada.

4. Prepare conjugado pronto a usar em Diluente Verde e adicione 50 $\mu$ L a todos os poços.



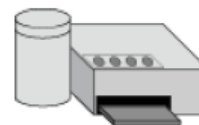
5. Adicione 50 $\mu$ L de amostras de plasma para teste e 50 $\mu$ L standards aos poços adequadas. Misture usando o agitador.



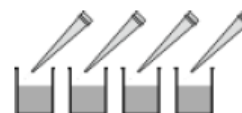
6. Incube durante 120 minutos à temperatura ambiente.



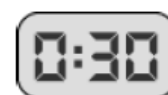
7. Lave os poços pelo menos 6 vezes com 400 $\mu$ L/poço de tampão de lavagem.



8. Adicione 100 $\mu$ L de Solução de Substrato Enzimático aos poços. Misture usando o agitador.



9. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente.



10. Adicione 50 $\mu$ L de solução de paragem a todos os poços. Misture usando o agitador.



11. Leia os resultados a 450nm com um filtro de referência de 620 a 650nm.



12. Analise os resultados.





Fabricado para:  
 Cellestis Limited (Australia) e Cellestis GmbH (Europe)  
 1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Austrália  
 Telefone (Aust) +61 3 9571 3500, (Europa) +49 6151 428 59-0  
 E-mail: [quantiferon@cellestis.com](mailto:quantiferon@cellestis.com)  
 Website: [www.cellestis.com](http://www.cellestis.com)

Doc. n.º 05990301C  
 August 2009



EC	REP
----	-----

MDSS GmbH  
 Schiffgraben 41  
 30175 Hannover  
 Germany

## 8. REFERÊNCIAS

---

- Abubakar I, Lipman M, Anderson C, Davies P, Zumla A. Tuberculosis in the UK--time to regain control. *BMJ*. 2011;343:d4281.
- Abubakar I, Stagg HR, Whitworth H, Lalvani A. How should I interpret an interferon gamma release assay result for tuberculosis infection? *Thorax*. 2013 Mar;68(3):298-301.
- Advisory Committee on Immunization Practices. General recommendations on immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2011 Jan 28;60(2):1-64.
- Afiune JB, Ide Neto J. Diagnóstico da tuberculose pulmonar escarro negativo. *J Pneumol*. 1993;19(1):37-41.
- Agresti A. An introduction to categorical data analysis. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 2007. Chapter 8, Models for matched pairs; p. 244-75.
- Ahmad S. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. *Respir Res*. 2010;11:169.
- Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:814943.
- Aichelburg MC, Rieger A, Breitenecker F, Pfistershammer K, Tittes J, Eltz S, et al. Detection and prediction of active tuberculosis disease by a whole-blood interferon-gamma release assay in HIV-1-infected individuals. *Clin Infect Dis*. 2009 Apr 1;48(7):954-62.
- Aichelburg MC, Reiberger T, Breitenecker F, Mandorfer M, Makristathis A, Rieger A. Reversion and conversion of interferon-gamma release assay results in HIV-1-infected individuals. *J Infect Dis*. 2014 Mar 1;209(5):729-33.
- Aissa K, Madhi F, Ronsin N, Delarocque F, Lecuyer A, Decludt B, et al. Evaluation of a model for efficient screening of tuberculosis contact subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 May 1;177(9):1041-7.
- Akolo C, Adetifa I, Shepperd S, Volmink J. Treatment of latent tuberculosis infection in HIV infected persons. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010(1):CD000171.
- Alpert PL, Munsiff SS, Gourevitch MN, Greenberg B, Klein RS. A prospective study of tuberculosis and human immunodeficiency virus infection: clinical manifestations and factors associated with survival. *Clin Infect Dis*. 1997 Apr;24(4):661-8.
- Altman DG. Practical statistics for medical research. London: Chapman and Hall; 1991. Chapter 10, Comparing groups: categorical data; p. 396-403.
- Amarante JM, Costa VL, Silva FA. Sensibilidade tuberculínica e vacina BCG entre os índios do Araguaia - MT/1997. *Bol Pneumol Sanit*. 1999;7(1):79-86.
- Amarante JM, Costa VL, Monteiro J. O controle da tuberculose entre os Índios Yanomami do Alto Rio Negro. *Bol Pneumol Sanit*. 2003;11(2):5-12.

American Thoracic Society. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This is a Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). This statement was endorsed by the Council of the Infectious Diseases Society of America. (IDSA), September 1999, and the sections of this statement. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Apr;161(4 Pt 2):S221-47.

American Thoracic Society. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: controlling tuberculosis in the United States. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Nov 1;172(9):1169-227.

Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*. 2000 Sep 23;356(9235):1099-104.

Andrews JR, Noubary F, Walensky RP, Cerda R, Losina E, Horsburgh CR. Risk of progression to active tuberculosis following reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Infect Dis*. 2012 Mar;54(6):784-91.

Anibarro L, Trigo M, Villaverde C, Pena A, Cortizo S, Sande D, et al. Interferon-gamma release assays in tuberculosis contacts: is there a window period? *Eur Respir J*. 2011 Jan;37(1):215-7.

Antonucci G, Girardi E, Raviglione MC, Ippolito G. Risk factors for tuberculosis in HIV-infected persons. A prospective cohort study. The Gruppo Italiano di Studio Tubercolosi e AIDS (GISTA). *JAMA*. 1995 Jul 12;274(2):143-8.

Atomiya AN, Uip DE, Leite OH. Evaluation of disease patterns, treatment and prognosis of tuberculosis in AIDS patient. *Braz J Infect Dis*. 2002 Feb;6(1):29-39.

Badri M, Ehrlich R, Pulerwitz T, Wood R, Maartens G. Tuberculosis should not be considered an AIDS-defining illness in areas with a high tuberculosis prevalence. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002a Mar;6(3):231-7.

Badri M, Wilson D, Wood R. Effect of highly active antiretroviral therapy on incidence of tuberculosis in South Africa: a cohort study. *Lancet*. 2002b Jun 15;359(9323):2059-64.

Bahceciler NN, Nuhoglu Y, Nursoy MA, Kodalli N, Barlan IB, Basaran MM. Inhaled corticosteroid therapy is safe in tuberculin-positive asthmatic children. *Pediatr Infect Dis J*. 2000 Mar;19(3):215-8.

Bahceciler NN. Does inhaled corticosteroid treatment result in a secondary immune deficiency predisposing to recurrent infections? *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2012 Dec;11(3):217-20.

Balcells ME, Perez CM, Chanqueo L, Lasso M, Villanueva M, Espinoza M, et al. A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int J Infect Dis*. 2008 Nov;12(6):645-52.



- Bamshad MJ, Olson SE. Ambiguidades que limitam uma definição de raça. *Sci Am Brasil* [Internet]. 2004 Jan [cited 2014 Apr 4];20:74-81. Available from: [http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/ambiguidades\\_que\\_limitam\\_uma\\_definicao\\_de\\_raca.html](http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/ambiguidades_que_limitam_uma_definicao_de_raca.html).
- Banfield S, Pascoe E, Thambiran A, Siafarikas A, Burgner D. Factors associated with the performance of a blood-based interferon-gamma release assay in diagnosing tuberculosis. *PLoS One*. 2012;7(6):e38556.
- Barreto AM, Melo FA, Campos HS, Castello-Branco LR, Caldas PC, Antas PR. Etiopatogenia e diagnóstico da tuberculose: o adoecimento. In: Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, editores. *Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço*. 6a ed. Rio de Janeiro: Educação a Distância da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca; 2008. p. 107-30.
- Bartalesi F, Vicedomini S, Goletti D, Fiorelli C, Fiori G, Melchiorre D, et al. QuantiFERON-TB Gold and the TST are both useful for latent tuberculosis infection screening in autoimmune diseases. *Eur Respir J*. 2009 Mar;33(3):586-93.
- Basta PC, Coimbra Junior CE, Escobar AL, Santos RV. [Epidemiologic aspects of tuberculosis in the Suruí Indians, Brazilian Amazon]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37(4):338-42. Portuguese.
- Basta PC, Coimbra CE Jr, Escobar AL, Santos RV, Alves LC, Fonseca Lde S. Survey for tuberculosis in an indigenous population of Amazonia: the Surui of Rondonia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006 Jun;100(6):579-85.
- Bates M, O'Grady J, Mwaba P, Chilukutu L, Mzyece J, Cheelo B, et al. Evaluation of the burden of unsuspected pulmonary tuberculosis and co-morbidity with non-communicable diseases in sputum producing adult inpatients. *PLoS One*. 2012;7(7):e40774.
- Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet*. 1999 Feb 6;353(9151):444-9.
- Bierrenbach AL, Cunha SS, Barreto ML, Pereira SM, Dourado I, Ichihara MY, et al. Tuberculin reactivity in a population of schoolchildren with high BCG vaccination coverage. *Rev Panam Salud Publica*. 2003 May;13(5):285-93.
- Blanc FX, Sok T, Laureillard D, Borand L, Rekacewicz C, Nerrienet E, et al. Earlier versus later start of antiretroviral therapy in HIV-infected adults with tuberculosis. *N Engl J Med*. 2011 Oct 20;365(16):1471-81.
- Boehme CC, Nabeta P, Hilleman D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med*. 2010 Sep 9;363(11):1005-15.

- Bourgarit A, Carcelain G, Martinez V, Lascoux C, Delcey V, Gicquel B, et al. Explosion of tuberculin-specific Th1-responses induces immune restoration syndrome in tuberculosis and HIV co-infected patients. *AIDS*. 2006 Jan 9;20(2):F1-7.
- Brassard P, Bruneau J, Schwartzman K, Senecal M, Menzies D. Yield of tuberculin screening among injection drug users. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004 Aug;8(8):988-93.
- Brassard P, Lowe AM, Bernatsky S, Kezouh A, Suissa S. Rheumatoid arthritis, its treatments, and the risk of tuberculosis in Quebec, Canada. *Arthritis Rheum*. 2009 Mar 15;61(3):300-4.
- British Medical Research Council. A double-blind placebo-controlled clinical trial of three antituberculosis chemoprophylaxis regimens in patients with silicosis in Hong Kong. Hong Kong Chest Service/Tuberculosis Research Centre, Madras/British Medical Research Council. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Jan;145(1):36-41.
- Bruce RM, Wise L. Tuberculosis after jejunoileal bypass for obesity. *Ann Intern Med*. 1977 Nov;87(5):574-6.
- Bua A, Mollicotti P, Ruggeri M, Madeddu G, Ferrandu G, Mura MS, et al. Interferon-gamma release assay in people infected with immunodeficiency virus. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Mar;17(3):402-4.
- Buchillet D, Gazin P. [Tuberculosis among the Amerindian population of the upper Rio Negro region]. *Cad Saude Publica*. 1998 Apr 30;14(1):181-5. Portuguese.
- Cailleaux-Cezar M, de AMD, Xavier GM, de Salles CL, de Mello FC, Ruffino-Netto A, et al. Tuberculosis incidence among contacts of active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009 Feb;13(2):190-5.
- Cain KP, McCarthy KD, Heilig CM, Monkongdee P, Tasaneeyapan T, Kanara N, et al. An algorithm for tuberculosis screening and diagnosis in people with HIV. *N Engl J Med*. 2010 Feb 25;362(8):707-16.
- Caminero Luna JA. Guía de la tuberculosis para médicos especialistas [Internet]. París: Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias; 2003. Capítulo 6, Diagnóstico de la infección tuberculosa: prueba de la tuberculina; [cited 2014 Apr 5]; p. 60-76. Available from: [http://www.tbrieder.org/publications/books\\_spanish/specialists\\_sp.pdf](http://www.tbrieder.org/publications/books_spanish/specialists_sp.pdf).
- Carvalho AC, Nunes ZB, Martins M, Araujo RO, Comelli M, Marinoni A, et al. Clinical presentation and survival of smear-positive pulmonary tuberculosis patients of a university general hospital in a developing country. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Dec;97(8):1225-30.
- Castelo Filho A, Kritski AL, Barreto AW, Lemos AC, Netto AR, Guimarães CA, et al. Il Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. *J Bras Pneumol* [Internet]. 2004 [cited 2014 Apr 5];30(Suppl 1):S1-S56. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v30s1/a01bv30s1.pdf>.

- Cattamanchi A, Hopewell PC, Gonzalez LC, Osmond DH, Masae Kawamura L, Daley CL, et al. A 13-year molecular epidemiological analysis of tuberculosis in San Francisco. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006 Mar;10(3):297-304.
- Cattamanchi A, Ssewenyana I, Davis JL, Huang L, Worodria W, den Boon S, et al. Role of interferon-gamma release assays in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients with advanced HIV infection. *BMC Infect Dis*. 2010;10:75.
- Cattamanchi A, Smith R, Steingart KR, Metcalfe JZ, Date A, Coleman C, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011 Mar 1;56(3):230-8.
- Caws M, Thwaites G, Dunstan S, Hawn TR, Lan NT, Thuong NT, et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2008 Mar;4(3):e1000034.
- Centers for Disease Control and Prevention (US). Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis. Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. *MMWR Recomm Rep*. 2005 Dec 16;54(RR-15):1-47.
- Centers for Disease Control and Prevention (US). Latent tuberculosis infection: a guide for primary health care providers [Internet]. Atlanta (GA): CDC; 2013 [cited 2014 Apr 5]. 36 p. Available from: <http://www.cdc.gov/TB/publications/LTBI/pdf/TargetedLTBI.pdf>.
- Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac" (SP). Casos confirmados e coeficiente de incidência de casos autóctones de doenças de notificação compulsória no Estado de São Paulo no período de 1998 a 2002 [Internet]. São Paulo: Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo; 2003 [cited 2014 Apr 5]. [about 2 screens]. (Série histórica). Available from: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/SH\\_TODAS.HTM](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/SH_TODAS.HTM).
- Chang KC, Leung CC, Tam CM. Tuberculosis risk factors in a silicotic cohort in Hong Kong. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001 Feb;5(2):177-84.
- Chee CB, Gan SH, Khinmar KW, Barkham TM, Koh CK, Liang S, et al. Comparison of sensitivities of two commercial gamma interferon release assays for pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2008 Jun;46(6):1935-40.
- Chee CB, Sester M, Zhang W, Lange C. Diagnosis and treatment of latent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Respirology*. 2013 Feb;18(2):205-16.
- Chen J, Sun J, Zhang R, Liu L, Zheng Y, Shen Y, et al. T-SPOT.TB in the diagnosis of active tuberculosis among HIV-infected patients with advanced immunodeficiency. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Mar;27(3):289-94.
- Chia S, Karim M, Elwood RK, FitzGerald JM. Risk of tuberculosis in dialysis patients: a population-based study. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998 Dec;2(12):989-91.

Cho SN. Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis. *Yonsei Med J*. 2007 Jun 30;48(3):347-59.

Chou NK, Liu LT, Ko WJ, Hsu RB, Chen YS, Yu HY, et al. Various clinical presentations of tuberculosis in heart transplant recipients. *Transplant Proc*. 2004 Oct;36(8):2396-8.

Clark SA, Martin SL, Pozniak A, Steel A, Ward B, Dunning J, et al. Tuberculosis antigen-specific immune responses can be detected using enzyme-linked immunospot technology in human immunodeficiency virus (HIV)-1 patients with advanced disease. *Clin Exp Immunol*. 2007 Nov;150(2):238-44.

Clerici M, Shearer GM. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today*. 1993 Mar;14(3):107-11.

Clerici M, Balotta C, Meroni L, Ferrario E, Riva C, Trabattoni D, et al. Type 1 cytokine production and low prevalence of viral isolation correlate with long-term nonprogression in HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996 Jul 20;12(11):1053-61.

Cobanoglu N, Ozcelik U, Kalyoncu U, Ozen S, Kiraz S, Gurcan N, et al. Interferon-gamma assays for the diagnosis of tuberculosis infection before using tumour necrosis factor-alpha blockers. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007 Nov;11(11):1177-82.

Cobelens F, van den Hof S, Pai M, Squire SB, Ramsay A, Kimerling ME. Which new diagnostics for tuberculosis, and when? *J Infect Dis*. 2012 May 15;205 Suppl 2:S191-8.

Cohen K, Meintjes G. Management of individuals requiring antiretroviral therapy and TB treatment. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010 Jan;5(1):61-9.

Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA*. 1994 Mar 2;271(9):698-702.

Comstock GW, Ferebee SH, Hammes LM. A controlled trial of community-wide isoniazid prophylaxis in Alaska. *Am Rev Respir Dis*. 1967 Jun;95(6):935-43.

Comstock GW. How much isoniazid is needed for prevention of tuberculosis among immunocompetent adults? *Int J Tuberc Lung Dis*. 1999 Oct;3(10):847-50.

Conde MB, Melo FA, Marques AM, Cardoso NC, Pinheiro VG, Dalcin Pde T, et al. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. *J Bras Pneumol*. 2009 Oct;35(10):1018-48.

Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med*. 2003 May 12;163(9):1009-21.

- Costa MR. Tuberculose e AIDS: caracterização clínico-epidemiológica da demanda de internação em hospital de infectologia no município de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2003.
- Croda MG, Trajber Z, Lima Rda C, Croda J. Tuberculosis control in a highly endemic indigenous community in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012 Apr;106(4):223-9.
- Cuevas LE, Petrucci R, Swaminathan S. Tuberculosis diagnostics for children in high-burden countries: what is available and what is needed. *Paediatr Int Child Health*. 2012 Nov;32 Suppl 2:S30-7.
- Dagneu AF, Hussein J, Abebe M, Zewdie M, Mihret A, Bedru A, et al. Diagnosis of latent tuberculosis infection in healthy young adults in a country with high tuberculosis burden and BCG vaccination at birth. *BMC Res Notes*. 2012;5:415.
- Daley CL, Small PM, Schechter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WR Jr, et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N Engl J Med*. 1992 Jan 23;326(4):231-5.
- Daniel TM. The immunology of tuberculosis. *Clin Chest Med*. 1980 May;1(2):189-201.
- Dannenberg AMJ. Pathophysiology: basic aspect. In: Schlossberg D, editor. *Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections*. 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co; 1999. p. 17-47.
- de Pinho AM, Santoro-Lopes G, Harrison LH, Schechter M. Chemoprophylaxis for tuberculosis and survival of HIV-infected patients in Brazil. *AIDS*. 2001 Nov 9;15(16):2129-35.
- Dean GL, Edwards SG, Ives NJ, Matthews G, Fox EF, Navaratne L, et al. Treatment of tuberculosis in HIV-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2002 Jan 4;16(1):75-83.
- Denkinger CM, Dheda K, Pai M. Guidelines on interferon-gamma release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion? *Clin Microbiol Infect*. 2011 Jun;17(6):806-14.
- Dheda K, van Zyl Smit R, Badri M, Pai M. T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs. low-burden settings. *Curr Opin Pulm Med*. 2009 May;15(3):188-200.
- Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Niemann S, Nienhaus A. Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 May 15;177(10):1164-70.

Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. *Chest*. 2010 Apr;137(4):952-68.

Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011 Jan;37(1):88-99.

Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess*. 2007 Jan;11(3):1-196.

Dinser R, Fousse M, Sester U, Albrecht K, Singh M, Kohler H, et al. Evaluation of latent tuberculosis infection in patients with inflammatory arthropathies before treatment with TNF-alpha blocking drugs using a novel flow-cytometric interferon-gamma release assay. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Feb;47(2):212-8.

Escobar AL, Coimbra CE Jr, Camacho LA, Portela MC. [Tuberculosis among indigenous populations in Rondonia, Amazonia, Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2001 Mar-Apr;17(2):285-98.

Farer LS, Lowell AM, Meador MP. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *Am J Epidemiol*. 1979 Feb;109(2):205-17.

Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006 Nov;10(11):1192-204.

Feld R, Bodey GP, Groschel D. Mycobacteriosis in patients with malignant disease. *Arch Intern Med*. 1976 Jan;136(1):67-70.

Fenhalls G, Stevens L, Bezuidenhout J, Amphlett GE, Duncan K, Bardin P, et al. Distribution of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha protein and CD8 T cells producing IL-12p40 mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Immunology*. 2002 Mar;105(3):325-35.

Fujita A, Ajisawa A, Harada N, Higuchi K, Mori T. Performance of a Whole-Blood Interferon-Gamma Release Assay with *Mycobacterium* RD1-Specific Antigens among HIV-Infected Persons. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011.

Gao XF, Wang L, Liu GJ, Wen J, Sun X, Xie Y, et al. Rifampicin plus pyrazinamide versus isoniazid for treating latent tuberculosis infection: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006 Oct;10(10):1080-90.

Garcia-Gasalla M, Fernandez-Baca V, Mir-Viladrich I, Cifuentes-Luna C, Campins-Rosello A, Payeras-Cifre A, et al. [Quantiferon-TB Gold In-Tube test in the diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010 Dec;28(10):685-9. Spanish.

- Garcia-Gasalla M, Fernandez-Baca V, Juan-Mas A, Payeras-Cifre A, Cifuentes-Luna C, Taberner-Ferrer R, et al. Use of Quantiferon-TB-Gold in Tube((R)) test for detecting latent tuberculosis in patients considered as candidates for anti-TNF therapy in routine clinical practice. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013 Feb;31(2):76-81.
- Garnelo L, Macedo G, Brandão L. Os povos indígenas e a construção das políticas de saúde no Brasil. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; 2003. 120 p.
- Gerald LB, Tang S, Bruce F, Redden D, Kimerling ME, Brook N, et al. A decision tree for tuberculosis contact investigation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Oct 15;166(8):1122-7.
- Getahun H, Kittikraisak W, Heilig CM, Corbett EL, Ayles H, Cain KP, et al. Development of a standardized screening rule for tuberculosis in people living with HIV in resource-constrained settings: individual participant data meta-analysis of observational studies. *PLoS Med*. 2011;8(1):e1000391.
- Girardi E, Antonucci G, Vanacore P, Libanore M, Errante I, Matteelli A, et al. Impact of combination antiretroviral therapy on the risk of tuberculosis among persons with HIV infection. *AIDS*. 2000 Sep 8;14(13):1985-91.
- Golub JE, Bur S, Cronin WA, Gange S, Baruch N, Comstock GW, et al. Delayed tuberculosis diagnosis and tuberculosis transmission. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006 Jan;10(1):24-30.
- Golub JE, Saraceni V, Cavalcante SC, Pacheco AG, Moulton LH, King BS, et al. The impact of antiretroviral therapy and isoniazid preventive therapy on tuberculosis incidence in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS*. 2007 Jul 11;21(11):1441-8.
- Gomes M, Saad Junior R, Stirbulov R. Pulmonary tuberculosis: relationship between sputum bacilloscopy and radiological lesions. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003 Sep-Oct;45(5):275-81.
- Gomez-Reino JJ, Carmona L, Valverde VR, Mola EM, Montero MD. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum*. 2003 Aug;48(8):2122-7.
- Gomez-Reino JJ, Carmona L, Angel Descalzo M. Risk of tuberculosis in patients treated with tumor necrosis factor antagonists due to incomplete prevention of reactivation of latent infection. *Arthritis Rheum*. 2007 Jun 15;57(5):756-61.
- Guelar A, Gatell JM, Verdejo J, Podzamczar D, Lozano L, Aznar E, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among HIV-infected patients. *AIDS*. 1993 Oct;7(10):1345-9.
- Gustafson P, Gomes VF, Vieira CS, Rabna P, Seng R, Johansson P, et al. Tuberculosis in Bissau: incidence and risk factors in an urban community in sub-Saharan Africa. *Int J Epidemiol*. 2004 Feb;33(1):163-72.

Gustafson P, Lisse I, Gomes V, Vieira CS, Lienhardt C, Naucler A, et al. Risk factors for positive tuberculin skin test in Guinea-Bissau. *Epidemiology*. 2007 May;18(3):340-7.

Hang NT, Lien LT, Kobayashi N, Shimbo T, Sakurada S, Thuong PH, et al. Analysis of factors lowering sensitivity of interferon-gamma release assay for tuberculosis. *PLoS One*. 2011;6(8):e23806.

Health Protection Agency. Health Protection Agency position statement on the use of Interferon Gamma Release Assay (IGRA) tests for Tuberculosis (TB) [Internet]. London: Health Protection Agency; 2012 [cited 2014 Apr 5]. 6 p. Available from: [http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1204186168242](http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1204186168242).

Hernández-Pando R, Chacón-Salinas R, Serafín-López J, Estrada I. Immunology, pathogenesis, virulence. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editores. *Tuberculosis 2007: from basic science to patient care*. Antwerp (BE): Institute of Tropical Medicine; 2007. p. 525-57.

Herrera MT, Torres M, Nevels D, Perez-Redondo CN, Ellner JJ, Sada E, et al. Compartmentalized bronchoalveolar IFN-gamma and IL-12 response in human pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009 Jan;89(1):38-47.

Hill AN, Becerra J, Castro KG. Modelling tuberculosis trends in the USA. *Epidemiol Infect*. 2012 Oct;140(10):1862-72.

Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann Intern Med*. 2001 May 15;134(10):978-96.

Horsburgh CR Jr Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States. *N Engl J Med*. 2004 May 13;350(20):2060-7.

Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis*. 1993 Dec;17(6):968-75.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010: características da população e dos domicílios. Resultados do universo [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2011 [cited 2014 Apr 11]. [about 1 screen]. Available from: [http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/93/cd\\_2010\\_caracteristicas\\_populacao\\_domicilios.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/93/cd_2010_caracteristicas_populacao_domicilios.pdf).

International Union Against Tuberculosis Committee on Prophylaxis. Efficacy of various durations of isoniazid preventive therapy for tuberculosis: five years of follow-up in the IUAT trial. *Bull World Health Organ*. 1982;60(4):555-64.

Ipuge YA, Rieder HL, Enarson DA. The yield of acid-fast bacilli from serial smears in routine microscopy laboratories in rural Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996 May-Jun;90(3):258-61.



Jasmer RM, Hahn JA, Small PM, Daley CL, Behr MA, Moss AR, et al. A molecular epidemiologic analysis of tuberculosis trends in San Francisco, 1991-1997. *Ann Intern Med.* 1999 Jun 15;130(12):971-8.

Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies. *PLoS Med.* 2008 Jul 15;5(7):e152.

Jones BE, Young SM, Antoniskis D, Davidson PT, Kramer F, Barnes PF. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Nov;148(5):1292-7.

Jones BE, Ryu R, Yang Z, Cave MD, Pogoda JM, Otaya M, et al. Chest radiographic findings in patients with tuberculosis with recent or remote infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Oct;156(4 Pt 1):1270-3.

Joos TJ, Miller WC, Murdoch DM. Tuberculin reactivity in bacille Calmette-Guerin vaccinated populations: a compilation of international data. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006 Aug;10(8):883-91.

Joshi R, Reingold AL, Menzies D, Pai M. Tuberculosis among health-care workers in low- and middle-income countries: a systematic review. *PLoS Med.* 2006 Dec;3(12):e494.

Juhl JH. Pulmonary tuberculosis. In: Juhl JH, Crummy AB, editores. *Essentials of radiologic imaging.* 6th ed. Philadelphia: Lippincot-Raven; 1993. p. 721-34.

Kabeer BS, Sikhamani R, Swaminathan S, Perumal V, Paramasivam P, Raja A. Role of interferon gamma release assay in active TB diagnosis among HIV infected individuals. *PLoS One.* 2009;4(5):e5718.

Kabeer BS, Sikhamani R, Raja A. Comparison of interferon gamma and interferon gamma-inducible protein-10 secretion in HIV-tuberculosis patients. *AIDS.* 2010 Jan 16;24(2):323-5.

Kaplan JE, Benson C, Holmes KK, Brooks JT, Pau A, Masur H. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep.* 2009 Apr 10;58(RR-4):1-207; quiz CE1-4.

Karim SS, Naidoo K, Grobler A, Padayatchi N, Baxter C, Gray AL, et al. Optimal timing of antiretroviral therapy during tuberculosis treatment: The SAPiT trial. In: 17th Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections; 2011 Feb 28; Boston [Internet]. Alexandria (VA): CROI; 2011 [cited 2014 Apr 5]. 17 p. Available from: [http://www.stoptb.org/wg/tb\\_hiv/assets/documents/5\\_SAPIT\\_CROI\\_2011.pdf](http://www.stoptb.org/wg/tb_hiv/assets/documents/5_SAPIT_CROI_2011.pdf).

Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol.* 2001 Oct;1(1):20-30.

- Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*. 2001 Oct 11;345(15):1098-104.
- Kerr-Pontes LR, Oliveira FA, Freire CA. [Tuberculosis associated with AIDS: the situation in a Northeastern region of Brazil]. *Rev Saude Publica*. 1997 Aug;31(4):323-9. Portuguese.
- Kim EY, Park MS, Kim YS, Kim SK, Chang J, Kang YA. Risk factors for false-negative results of QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay in non-HIV-infected patients with culture-confirmed tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Jul;70(3):324-9.
- Kim HA, Yoo CD, Baek HJ, Lee EB, Ahn C, Han JS, et al. Mycobacterium tuberculosis infection in a corticosteroid-treated rheumatic disease patient population. *Clin Exp Rheumatol*. 1998 Jan-Feb;16(1):9-13.
- Klautau GB, Kuschnaroff TM. Clinical forms and outcome of tuberculosis in HIV-infected patients in a tertiary hospital in Sao Paulo - Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005 Dec;9(6):464-78.
- Kobashi Y, Sugiu T, Mouri K, Obase Y, Miyashita N, Oka M. Indeterminate results of QuantiFERON TB-2G test performed in routine clinical practice. *Eur Respir J*. 2009 Apr;33(4):812-5.
- Kritski AL, Conde MB, Souza GR. Tuberculose: do ambulatório à enfermaria. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2000. 303 p.
- Kwakernaak AJ, Houtman PM, Weel JF, Spoorenberg JP, Jansen TL. A comparison of an interferon-gamma release assay and tuberculin skin test in refractory inflammatory disease patients screened for latent tuberculosis prior to the initiation of a first tumor necrosis factor alpha inhibitor. *Clin Rheumatol*. 2011 Apr;30(4):505-10.
- Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy. *Chest*. 2007 Jun;131(6):1898-906.
- Lalvani A, Millington KA. T cell-based diagnosis of childhood tuberculosis infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2007 Jun;20(3):264-71.
- Lannoy LH, Cortez-Escalante JJ, Evangelista Mdo S, Romero GA. Tuberculosis incidence and risk factors among patients living with HIV/AIDS in public health service institutions in Brasilia, Federal District. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 Nov-Dec;41(6):549-55.
- Lawn SD, Badri M, Wood R. Tuberculosis among HIV-infected patients receiving HAART: long term incidence and risk factors in a South African cohort. *AIDS*. 2005a Dec 2;19(18):2109-16.
- Lawn SD, Bekker LG, Miller RF. Immune reconstitution disease associated with mycobacterial infections in HIV-infected individuals receiving antiretrovirals. *Lancet Infect Dis*. 2005b Jun;5(6):361-73.

- Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet*. 2011 Jul 2;378(9785):57-72.
- Lee CH, Kim K, Hyun MK, Jang EJ, Lee NR, Yim JJ. Use of inhaled corticosteroids and the risk of tuberculosis. *Thorax*. 2013 Dec;68(12):1105-13.
- Leidl L, Mayanja-Kizza H, Sotgiu G, Baseke J, Ernst M, Hirsch C, et al. Relationship of immunodiagnostic assays for tuberculosis and numbers of circulating CD4+ T-cells in HIV infection. *Eur Respir J*. 2010 Mar;35(3):619-26.
- Lemos AC, Matos ED, Bittencourt CN. Prevalence of active and latent TB among inmates in a prison hospital in Bahia, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2009 Jan;35(1):63-8.
- Levino A, de Oliveira RM. [Tuberculosis among the indian population in Sao Gabriel da Cachoeira, Amazonas State, Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2007 Jul;23(7):1728-32. Portuguese.
- Lighter J, Rigaud M. Diagnosing childhood tuberculosis: traditional and innovative modalities. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2009 Mar;39(3):61-88.
- Ling DI, Pai M, Davids V, Brunet L, Lenders L, Meldau R, et al. Are interferon-gamma release assays useful for diagnosing active tuberculosis in a high-burden setting? *Eur Respir J*. 2011 Sep;38(3):649-56.
- Linh NN, Marks GB, Crawford AB. Radiographic predictors of subsequent reactivation of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007 Oct;11(10):1136-42.
- MacIntyre CR, Plant AJ. Preventability of incident cases of tuberculosis in recently exposed contacts. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998 Jan;2(1):56-61.
- Mahan CS, Johnson DF, Curley C, van der Kuyp F. Concordance of a positive tuberculin skin test and an interferon gamma release assay in bacille Calmette-Guerin vaccinated persons. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011 Feb;15(2):174-8, i.
- Mantoux M. La voie intradermique en tuberculinothérapie. *Presse Med*. 1912;20:146-8.
- Markova R, Drenska R, Minchev P, Todorova Y, Ciccozzi M, Amicosante M. Association of age with the level of response in the QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay for children with active tuberculosis. *New Microbiol*. 2011 Jan;34(1):81-5.
- Marks SM, Taylor Z, Qualls NL, Shrestha-Kuwahara RJ, Wilce MA, Nguyen CH. Outcomes of contact investigations of infectious tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Dec;162(6):2033-8.
- Marques AM, da Cunha RV. [Assisted treatment and tuberculosis cure and treatment dropout rates in the Guarani-Kaiwa Indian nation in the municipality of Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2003 Sep-Oct;19(5):1405-11. Portuguese.

- Marques AM, Pompilio MA, Santos SC, Garnes SJ, Cunha RV. [Tuberculosis among Brazilian indigenous individuals aged less than 15 years-old in State of Mato Grosso do Sul, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Nov-Dec;43(6):700-4. Portuguese.
- Martinson NA, Barnes GL, Moulton LH, Msandiwa R, Hausler H, Ram M, et al. New regimens to prevent tuberculosis in adults with HIV infection. *N Engl J Med*. 2011 Jul 7;365(1):11-20.
- Matulis G, Juni P, Villiger PM, Gadola SD. Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases: performance of a Mycobacterium tuberculosis antigen-specific interferon gamma assay. *Ann Rheum Dis*. 2008 Jan;67(1):84-90.
- Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K. Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection - United States, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010 Jun 25;59(RR-5):1-25.
- McAdams HP, Erasmus J, Winter JA. Radiologic manifestations of pulmonary tuberculosis. *Radiol Clin North Am*. 1995 Jul;33(4):655-78.
- McNerney R, Maeurer M, Abubakar I, Marais B, McHugh TD, Ford N, et al. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. *J Infect Dis*. 2012 May 15;205 Suppl 2:S147-58.
- Meintjes G, Wilkinson RJ, Morroni C, Pepper DJ, Rebe K, Rangaka MX, et al. Randomized placebo-controlled trial of prednisone for paradoxical tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *AIDS*. 2010 Sep 24;24(15):2381-90.
- Melo FA, Oliveira ML, Waldman CC. Tuberculose e sorologia anti-HIV positiva: revisão de 32 casos internados. *J Pneumol* 1990;16(Supl 1):92.
- Melo FA, Afiune JB. Transmissão e imunopatogenia da tuberculose. *J Pneumol*. 1993;19(1):19-24.
- Melo FA, Afiune JB, Hijjar MA, Gomes M, Rodrigues DS, Klautau GB. Tuberculose. In: Veronesi R, Foccacia R, editores. *Tratado de infectologia*. 3a ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 1139-206.
- Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med*. 2007 Mar 6;146(5):340-54.
- Metcalfe JZ, Everett CK, Steingart KR, Cattamanchi A, Huang L, Hopewell PC, et al. Interferon-gamma release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis*. 2011 Nov 15;204 Suppl 4:S1120-9.
- Miller WT, Miller WT Jr. Tuberculosis in the normal host: radiological findings. *Semin Roentgenol*. 1993 Apr;28(2):109-18.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Critérios de definição de casos de aids em adultos e crianças [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2004 [cited 2014 Apr 10]. 56 p. (Série manuais; no. 60). Available from: [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/criterios\\_aids\\_2004.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/criterios_aids_2004.pdf).

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde, Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de bacteriologia da tuberculose [Internet]. 3a ed. 3a ed. Edição comemorativa. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2005 [cited 2014 Apr 3]. 240 p. Available from: [http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/81/manual-de-bacteriologia-da-tuberculose-\[81-080909-SES-MT\].pdf](http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/81/manual-de-bacteriologia-da-tuberculose-[81-080909-SES-MT].pdf).

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Manual de adesão ao tratamento para pessoas vivendo com HIV e Aids [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2008a [cited 2014 Apr 5]. 130 p. (Série A. Normas e manuais técnicos); (Série manuais; no. 84). Available from: [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/Manual\\_de\\_adesao\\_web.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/Manual_de_adesao_web.pdf).

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos infectados pelo HIV: 2008 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2008b [cited 2014 Apr 5]. 244 p. (Série Manuais; no. 2). Available from: [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/consensoAdulto005c\\_2008montado.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/consensoAdulto005c_2008montado.pdf).

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia antirretroviral em gestantes: manual de bolso [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2010 [cited 2014 Apr 5]. 172 p. (Série Manuais; no. 46). Available from: [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/consenso\\_gestantes\\_2010\\_vf.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/consenso_gestantes_2010_vf.pdf).

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2011 [cited 2014 Apr 5]. 284 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Available from: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/TB/mat\\_tec/manuais/MS11\\_Manual\\_Recom.pdf](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/TB/mat_tec/manuais/MS11_Manual_Recom.pdf).

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para adultos vivendo com HIV/AIDS [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2013 [cited 2014 Apr 5]. 75 p. Available from: [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/52934/\\_p\\_vers\\_atil\\_de\\_o\\_preliminar\\_do\\_protocolo\\_cl\\_iacute\\_26118.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/52934/_p_vers_atil_de_o_preliminar_do_protocolo_cl_iacute_26118.pdf).

Moran-Mendoza O, Marion SA, Elwood K, Patrick DM, FitzGerald JM. Tuberculin skin test size and risk of tuberculosis development: a large population-based study in contacts. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007 Sep;11(9):1014-20.

Moulton LH, Golub JE, Durovni B, Cavalcante SC, Pacheco AG, Saraceni V, et al. Statistical design of THRio: a phased implementation clinic-randomized study of a tuberculosis preventive therapy intervention. *Clin Trials*. 2007;4(2):190-9.

- Mtei L, Matee M, Herfort O, Bakari M, Horsburgh CR, Waddell R, et al. High rates of clinical and subclinical tuberculosis among HIV-infected ambulatory subjects in Tanzania. *Clin Infect Dis*. 2005 May 15;40(10):1500-7.
- Mudenda V, Lucas S, Shibemba A, O'Grady J, Bates M, Kapata N, et al. Tuberculosis and tuberculosis/HIV/AIDS-associated mortality in Africa: the urgent need to expand and invest in routine and research autopsies. *J Infect Dis*. 2012 May 15;205 Suppl 2:S340-6.
- Muller M, Wandel S, Colebunders R, Attia S, Furrer H, Egger M. Immune reconstitution inflammatory syndrome in patients starting antiretroviral therapy for HIV infection: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2010 Apr;10(4):251-61.
- Naidoo K, Yende-Zuma N, Padayatchi N, Jithoo N, Nair G, Bamber S, et al. The immune reconstitution inflammatory syndrome after antiretroviral therapy initiation in patients with tuberculosis: findings from the SApiT trial. *Ann Intern Med*. 2012 Sep 4;157(5):313-24.
- National Institute for Health and Clinical Excellence. (GB). Tuberculosis Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control [Internet]. Manchester: National Institute for Health and Clinical Excellence; 2011 [cited 2014 Apr 5]. 67 p. Available from: <http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/13422/53642/53642.pdf>.
- Noertjojo K, Tam CM, Chan SL, Tan J, Chan-Yeung M. Contact examination for tuberculosis in Hong Kong is useful. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002 Jan;6(1):19-24.
- Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New diagnostic methods for tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2009 Apr;22(2):174-82.
- Oni T, Patel J, Gideon HP, Seldon R, Wood K, Hlombe Y, et al. Enhanced diagnosis of HIV-1-associated tuberculosis by relating T-SPOT.TB and CD4 counts. *Eur Respir J*. 2010 Sep;36(3):594-600.
- Pacheco AG, Durovni B, Cavalcante SC, Lauria LM, Moore RD, Moulton LH, et al. AIDS-related tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*. 2008;3(9):e3132.
- Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*. 2008 Aug 5;149(3):177-84.
- Pakasi TA, Karyadi E, Dolmans WM, van der Meer JW, van der Velden K. Malnutrition and socio-demographic factors associated with pulmonary tuberculosis in Timor and Rote Islands, Indonesia. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009 Jun;13(6):755-9.
- Palazzo R, Spensieri F, Massari M, Fedele G, Frasca L, Carrara S, et al. Use of whole-blood samples in in-house bulk and single-cell antigen-specific gamma interferon assays for surveillance of Mycobacterium tuberculosis infections. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 Feb;15(2):327-37.

- Pape JW, Liautaud B, Thomas F, Mathurin JR, St Amand MM, Boncy M, et al. Characteristics of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in Haiti. *N Engl J Med*. 1983 Oct 20;309(16):945-50.
- Pedral-Sampaio DB, Netto EM, Brites C, Badaro R. Treating tuberculosis in AIDS patients: when to start and how long to keep giving drugs? *AIDS*. 2002 Sep 6;16(13):1845.
- Pepper DJ, Marais S, Maartens G, Rebe K, Morroni C, Rangaka MX, et al. Neurologic manifestations of paradoxical tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome: a case series. *Clin Infect Dis*. 2009 Jun 1;48(11):e96-107.
- Pinto WP, Hadad DJ, Palhares MC, Ferrazoli L, Telles MA, Ueki SY, et al. Drug resistance of *M. tuberculosis* isolated from patients with HIV infection seen at an AIDS Reference Center in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1996 Jan-Feb;38(1):15-21.
- Pozniak AL, Ormerod LP, Miller R. Reply: Treatment of tuberculosis in HIV-infected patients. *AIDS*. 1999 Jul 30;13(11):1431-2.
- Rangaka MX, Wilkinson KA, Seldon R, Van Cutsem G, Meintjes GA, Morroni C, et al. Effect of HIV-1 infection on T-Cell-based and skin test detection of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Mar 1;175(5):514-20.
- Rangaka MX, Wilkinson KA, Glynn JR, Ling D, Menzies D, Mwansa-Kambafwile J, et al. Predictive value of interferon-gamma release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012 Jan;12(1):45-55.
- Rathi SK, Akhtar S, Rahbar MH, Azam SI. Prevalence and risk factors associated with tuberculin skin test positivity among household contacts of smear-positive pulmonary tuberculosis cases in Umerkot, Pakistan. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002 Oct;6(10):851-7.
- Redelman-Sidi G, Sepkowitz KA. IFN-gamma release assays in the diagnosis of latent tuberculosis infection among immunocompromised adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Aug 15;188(4):422-31.
- Reid A, Scano F, Getahun H, Williams B, Dye C, Nunn P, et al. Towards universal access to HIV prevention, treatment, care, and support: the role of tuberculosis/HIV collaboration. *Lancet Infect Dis*. 2006 Aug;6(8):483-95.
- Richeldi L, Losi M, D'Amico R, Luppi M, Ferrari A, Mussini C, et al. Performance of tests for latent tuberculosis in different groups of immunocompromised patients. *Chest*. 2009 Jul;136(1):198-204.
- Rodrigues D, Cunha RM, Kallas EG, Salomao R. Distribution of naive and memory/effector CD4 + T lymphocytes and expression of CD38 on CD8 + T lymphocytes in AIDS patients with tuberculosis. *Braz J Infect Dis*. 2003 Apr;7(2):161-5.

Rose CE Jr, Zerbe GO, Lantz SO, Bailey WC. Establishing priority during investigation of tuberculosis contacts. *Am Rev Respir Dis*. 1979 Apr;119(4):603-9.

Rosemberg J, Tarantino AB, Paula A, Magrão SL. Tuberculose. In: Tarantino AB, editor. *Doenças pulmonares*. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 233-61.

Roth VR, Garrett DO, Laserson KF, Starling CE, Kritski AL, Medeiros EA, et al. A multicenter evaluation of tuberculin skin test positivity and conversion among health care workers in Brazilian hospitals. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005 Dec;9(12):1335-42.

Rusen ID, Squire SB, Billo NE. Poverty and lung health. *Expert Rev Respir Med*. 2010 Apr;4(2):163-5.

Sacchi FP, Croda MG, Estevan AO, Ko AI, Croda J. Sugar cane manufacturing is associated with tuberculosis in an indigenous population in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013 Mar;107(3):152-7.

Salomon N, Perlman DC, Friedmann P, Ziluck V, Des Jarlais DC. Prevalence and risk factors for positive tuberculin skin tests among active drug users at a syringe exchange program. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000 Jan;4(1):47-54.

Sanne I, Mommeja-Marin H, Hinkle J, Bartlett JA, Lederman MM, Maartens G, et al. Severe hepatotoxicity associated with nevirapine use in HIV-infected subjects. *J Infect Dis*. 2005 Mar 15;191(6):825-9.

Sant'anna CC, Mourgues LV, Ferrero F, Balanzat AM. [Diagnosis and treatment of tuberculosis in children: an updated review of an old problem]. *J Pediatr*. 2002;78(Supl 2):205-14. Portuguese.

Santin M, Munoz L, Rigau D. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of tuberculosis and tuberculosis infection in HIV-infected adults: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(3):e32482.

Santoro-Lopes G, de Pinho AM, Harrison LH, Schechter M. Reduced risk of tuberculosis among Brazilian patients with advanced human immunodeficiency virus infection treated with highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2002 Feb 15;34(4):543-6.

Sauzullo I, Mengoni F, Scrivo R, Valesini G, Potenza C, Skroza N, et al. Evaluation of QuantiFERON-TB Gold In-Tube in human immunodeficiency virus infection and in patient candidates for anti-tumour necrosis factor-alpha treatment. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010 Jul;14(7):834-40.

Schatz M, Patterson R, Kloner R, Falk J. The prevalence of tuberculosis and positive tuberculin skin tests in a steroid-treated asthmatic population. *Ann Intern Med*. 1976 Mar;84(3):261-5.

Schiffer JT, Sterling TR. Timing of antiretroviral therapy initiation in tuberculosis patients with AIDS: a decision analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007 Feb 1;44(2):229-34.



- Schluger NW, Huberman R, Wolinsky N, Dooley R, Rom WN, Holzman RS. Tuberculosis infection and disease among persons seeking social services in New York City. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1997 Feb;1(1):31-7.
- Seddon JA, Warren RM, Enarson DA, Beyers N, Schaaf HS. Drug-resistant tuberculosis transmission and resistance amplification within families. *Emerg Infect Dis*. 2012 Aug;18(8):1342-5.
- Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, Vermund SH, Klein RS, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1989 Mar 2;320(9):545-50.
- Serra FC, Hadad D, Orofino RL, Marinho F, Lourenco C, Morgado M, et al. Immune reconstitution syndrome in patients treated for HIV and tuberculosis in Rio de Janeiro. *Braz J Infect Dis*. 2007 Oct;11(5):462-5.
- Sester M, Sotgiu G, Lange C, Giehl C, Girardi E, Migliori GB, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011 Jan;37(1):100-11.
- Silva LC. Tuberculose extrapulmonar (excetuando o derrame pleural). *J Pneumol*. 1993;19(83-7).
- Smith KC, Armitage L, Wanger A. A review of tuberculosis: reflections on the past, present and future of a global epidemic disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2003 Oct;1(3):483-91.
- Song AT, Schout D, Novaes HM, Goldbaum M. Clinical and epidemiological features of AIDS/tuberculosis comorbidity. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2003 Jul-Aug;58(4):207-14.
- Squire SB, Ramsay AR, van den Hof S, Millington KA, Langley I, Bello G, et al. Making innovations accessible to the poor through implementation research. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011 Jul;15(7):862-70.
- Sterling TR, Villarino ME, Borisov AS, Shang N, Gordin F, Bliven-Sizemore E, et al. Three months of rifapentine and isoniazid for latent tuberculosis infection. *N Engl J Med*. 2011 Dec 8;365(23):2155-66.
- Sultan B, Benn P, Mahungu T, Young M, Mercey D, Morris-Jones S, et al. Comparison of two interferon-gamma release assays (QuantiFERON-TB Gold In-Tube and T-SPOT.TB) in testing for latent tuberculosis infection among HIV-infected adults. *Int J STD AIDS*. 2013 Oct;24(10):775-9.
- Suthar AB, Lawn SD, del Amo J, Getahun H, Dye C, Sculier D, et al. Antiretroviral therapy for prevention of tuberculosis in adults with HIV: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2012;9(7):e1001270.
- Takenami I, Loureiro C, Machado A Jr, Emodi K, Riley LW, Arruda S. Blood Cells and Interferon-Gamma Levels Correlation in Latent Tuberculosis Infection. *ISRN Pulmonol*. 2013;2013.

Talati NJ, Seybold U, Humphrey B, Aina A, Tapia J, Weinfurter P, et al. Poor concordance between interferon-gamma release assays and tuberculin skin tests in diagnosis of latent tuberculosis infection among HIV-infected individuals. *BMC Infect Dis.* 2009;9:15.

Tegbaru B, Wolday D, Messele T, Legesse M, Mekonnen Y, Miedema F, et al. Tuberculin skin test conversion and reactivity rates among adults with and without human immunodeficiency virus in urban settings in Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Jul;13(7):784-9.

Tsiouris SJ, Coetzee D, Toro PL, Austin J, Stein Z, El-Sadr W. Sensitivity analysis and potential uses of a novel gamma interferon release assay for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2006 Aug;44(8):2844-50.

Tubach F, Salmon D, Ravaud P, Allanore Y, Goupille P, Breban M, et al. Risk of tuberculosis is higher with anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody therapy than with soluble tumor necrosis factor receptor therapy: The three-year prospective French Research Axed on Tolerance of Biotherapies registry. *Arthritis Rheum.* 2009 Jul;60(7):1884-94.

Vassall A, van Kampen S, Sohn H, Michael JS, John KR, den Boon S, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis with the Xpert MTB/RIF assay in high burden countries: a cost-effectiveness analysis. *PLoS Med.* 2011 Nov;8(11):e1001120.

Vesenbeckh SM, Schonfeld N, Mauch H, Bergmann T, Wagner S, Bauer TT, et al. The use of interferon gamma release assays in the diagnosis of active tuberculosis. *Tuberc Res Treat.* 2012;2012:768723.

von Reyn CF, Kimambo S, Mtei L, Arbeit RD, Maro I, Bakari M, et al. Disseminated tuberculosis in human immunodeficiency virus infection: ineffective immunity, polyclonal disease and high mortality. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011 Aug;15(8):1087-92.

Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, FitzGerald JM. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax.* 2002 Sep;57(9):804-9. Erratum in: *Thorax.* 2003;58(2):188.

Westby M, Manca F, Dalgleish AG. The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection. *Immunol Today.* 1996 Mar;17(3):120-6.

Wolf T, Goetsch U, Oremek G, Bickel M, Khaykin P, Haberl A, et al. Tuberculosis skin test, but not interferon-gamma-releasing assays is affected by BCG vaccination in HIV patients. *J Infect.* 2013 Apr;66(4):376-80.

World Health Organization. Implementing The Stop TB Strategy: a handbook for national tuberculosis control programmes [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2008 [cited 2014 Apr 5]. 184 p. (WHO/HTM/TB/2008.401). Available from: [http://www.who.int/tb/publications/2008/who\\_htm\\_tb\\_2008\\_401\\_eng.pdf](http://www.who.int/tb/publications/2008/who_htm_tb_2008_401_eng.pdf).

World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. WHO report 2009 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2009 [cited 2014 Apr 5]. 78 p. (WHO/HTM/TB/2009.411). Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563802\\_eng\\_doc.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563802_eng_doc.pdf).

World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2011 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2011a [cited 2014 Apr 5]. 246 p. (WHO/HTM/TB/2011.16). Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564380\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564380_eng.pdf).

World Health Organization. Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2011b [cited 2014 Apr 5]. 135 p. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241500708\\_annexes\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241500708_annexes_eng.pdf).

World Health Organization. Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAs) in low- and middle-income countries: policy statement [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2011c [cited 2014 Apr 5]. 61 p. (WHO/HTM/TB/2011.18). Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502672\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502672_eng.pdf).

World Health Organization. Global tuberculosis report 2012 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2012 [cited 2014 Apr 5]. 89 p. (WHO/HTM/TB/2012.6). Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf).

World Health Organization. Global tuberculosis report 2013 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2013 [cited 2014 Apr 5]. 289 p. (WHO/HTM/TB/2013.11). Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf).

Yokoyama T, Sato R, Rikimaru T, Hirai R, Aizawa H. Tuberculosis associated with gastrectomy. *J Infect Chemother*. 2004 Oct;10(5):299-302.

Yuhara LS, Sacchi FP, Croda J. Impact of latent infection treatment in indigenous populations. *PLoS One*. 2013;8(7):e71201.

Zignol M, van Gemert W, Falzon D, Sismanidis C, Glaziou P, Floyd K, et al. Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an updated analysis, 2007-2010. *Bull World Health Organ*. 2012 Feb 1;90(2):111-9D.

Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. Tuberculosis. *N Engl J Med*. 2013 Feb 21;368(8):745-55.

Zwerling A, van den Hof S, Scholten J, Cobelens F, Menzies D, Pai M. Interferon-gamma release assays for tuberculosis screening of healthcare workers: a systematic review. *Thorax*. 2012 Jan;67(1):62-70.

ABSTRACT

---

## Abstract

Tuberculosis (TB) is a serious public health problem in Brazil and the main cause of death in patients with AIDS. Up to 2001, the Tuberculin Skin Test (TST) was the only available tool to evaluate individuals with suspected latent infection by *M. tuberculosis* (LTBI); a new test has been increasingly used in the past recent years, the *Interferon Gamma Release Assay* (IGRA), which measures the amount of Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) secreted by circulating T-cells following *ex vivo* stimulation with specific antigens of *M. tuberculosis* (Mtb). However, the role of IGRA for the diagnosis of LTBI and active-TB in HIV-infected patients has not yet been established. This cross-sectional study compared TST and IGRA (QuantiFERON®-TB Gold In Tube, Cellestis, Carnegie, Austrália) for the diagnosis of LTBI and active TB. A total of 270 individuals were divided into three groups: group 1 comprised 90 HIV-infected patients under risk of LTBI; group 2 comprised 90 HIV-infected patients with active-TB and group 3 comprised 90 HIV non-infected individuals under risk of LTBI. In group 1, IGRA showed better performance, and better concordance with the diagnosis of LTBI than TST (Kappa: 0,769 and 0,384, respectively) as well as a good concordance with risk of infection by Mtb (Kappa: 0,724). In group 3, TST and IGRA showed good sensitivity (92,11% and 97,37%, respectively); TST showed better concordance with the diagnosis of LTBI than IGRA (Kappa: 0,580 and 0,214, respectively); however, the negative predictive value (NPV) of IGRA according to risk was higher than for TST (95,24% and 57,14%, respectively). In group 2, sensitivity of both tests was low (TST: 25,56% and IGRA: 65,56%), however, IGRA showed better performance than TST in patients with more severe immunosuppression, assessed by TCD4 blood count (cut off for IGRA: 187 cells/mm<sup>3</sup> and for TST: 473 cells/mm<sup>3</sup>). We concluded that for the detection of LTBI, IGRA showed better performance than TST on HIV-infected and non-infected patients as well as better association with the risk of infection by Mtb. However in HIV non-infected patients TST showed better association with the diagnosis of LTBI whereas NPV of IGRA was found superior. In HIV-infected patients with active-TB, IGRA showed better performance than TST for the diagnosis of active-TB and was also able to detect the disease in patients with more severe immunosuppression; however, both tests demonstrated low sensitivity and the results were not considered adequate for the diagnosis of the disease. The

present study indicates that IGRA is a good diagnostic method for LTBI, but not for active-TB.



## APÊNDICE A – Termos de Aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa



### APÊNDICE A.1- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO IIER

COORDENADORIA DOS SERVIÇOS DE SAÚDE  
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMÍLIO RIBAS"

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. Dr. Arnaldo, 165 - Cerqueira César - São Paulo - SP

CEP: 01246-900 – TEL: 3896-1406

E-mail: comitedeetica-ier@ig.com.br

### PARECER

PROTOCOLO DE PESQUISA N.º 09/11

PARECER N.º 073/2011

Data: 13/4/2011

*Título da Pesquisa: "Comparação do Teste Tuberculino com o ensaio de liberação de Interferon-Gama (ELIG/IGRA) para detecção da infecção latente pelo Mycobacterium tuberculosis e da Tuberculose"*

*Pesquisador Responsável: Dra. Giselle Burlamaqui Klautau*

**CONSIDERAÇÕES:** O Comitê de Ética em Pesquisa considera respondidas as pendências do parecer anterior e Aprova o estudo e seu TCLE.

(X) APROVADO

( ) APROVADO COM RECOMENDAÇÕES

( ) REPROVADO

( ) COM PENDÊNCIAS- OBS.: a ausência de resposta em 60 dias, acarretará em arquivamento do processo por falta de interesse do pesquisador.

TEMÁTICA ESPECIAL

☐ SIM ☐ NÃO

CONEP

☐ SIM ☐ NÃO

SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) ☐ SIM ☐ NÃO

*Dra. Anna Christina Nunes D'Ambrosio  
Comitê de Ética em Pesquisas - I.I.E.R*



## APÊNDICE A.2- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA ISCMSP



### IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE S PAULO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Rua Santa Isabel, 305 4º Santa Cecília CEP 01221-010 São Paulo – SP.

Tel.: (11) 2176-7689 Fax: (11) 2176-7688 E-mail: [eticamedbernadete@santacasasp.org.br](mailto:eticamedbernadete@santacasasp.org.br)

São Paulo, 25 de abril de 2011.

**Projeto nº029/11**  
Informe este número para  
identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr. (a).

**Dra. Giselle Burlamaqui Klautau**

Departamento de Medicina

O Comitê de Ética e Pesquisa da ISCMSP, em reunião ordinária, dia **23/02/11** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **"Comparação do teste Tuberculínico com o ensaio de liberação de Interferon-Gama (ELIG/IGRA) para detecção da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* e da tuberculose doença em pacientes infectados pelo HIV/AIDS, versão 1 de 06/01/11"** emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

☒ **Aprovado (inclusive TCLE);**

☐ **Com pendências** há modificações ou informações relevantes a serem atendida em 60 dias, (enviar as alterações em duas cópias);

☐ **Retirado**, (por não ser reapresentado no prazo determinado);

☐ **Não aprovado:** e

☐ **Aprovado (inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS -CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias.** Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.

  
**Prof. Dr. Nelson Keiske Ono**

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa – ISCMSP

Conforme a Resolução 196/96, o relatório parcial deve ser apresentado de forma detalhada ao CEP, inicialmente em 25/10/2011 e a cada seis meses. Conforme ofício circular 0226/CONEP/CNS, datado de 29-10-2010, a suspensão de estudo e relatório final deverão ser apresentados conforme modelo elaborado pela CONEP. Impressos disponíveis em nosso site: [www.santacasasp.org.br](http://www.santacasasp.org.br)

## APÊNDICE A.3- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIFESP



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 8 de abril de 2011.  
CEP 0325/11

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) GISELLE BURLAMAQUI KLAUTAU

Co-Investigadores: Denise do Socorro da Silva Rodrigues; Gilberto Turcato Junior; Fernando Augusto Fiuza de Mello; Marcelo Nascimento Burattini; Antonio Carlos Campos Pignatari; Martha Gabriela Celle Rivero;

Disciplina/Departamento: Infectologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: FAPESP.

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Comparação do teste tuberculínico com o ensaio de liberação de interferon-gama (ELIG/IGRA) para detecção da infecção latente pelo Mycobacterium tuberculosis e da tuberculose doença em pacientes infectados pelo HIV/AIDS”.**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo clínico com intervenção diagnóstica não randomizado.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco mínimo, desconforto leve, com coleta de sangue.

OBJETIVOS: Estudar o comportamento de um teste para o diagnóstico da infecção latente pelo Mycobacterium tuberculosis e para o diagnóstico da tuberculose doença, baseado na detecção in vitro da produção de interferon-gama por linfócitos ativados após estimulação por antígenos específicos, pela técnica de ELISA, em adultos infectados pelo HIV/AIDS em diferentes estágios de imunodeficiência..

RESUMO: Pacientes com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos, portadores de infecção pelo HIV (com diferentes graus de imunodepressão) com TB doença ou com TBIL (infecção latente) e pacientes com TBIL sem infecção pelo HIV atendidos no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, no Instituto Clemente Ferreira, nos Hospitais da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo compõem a população-alvo deste estudo. A amostra será composta por 270 pacientes, divididos em 2 grupos: 180 pacientes infectados pelo HIV/AIDS (90 com TBIL e 90 com TB doença) e 90 pacientes sem infecção pelo HIV. Serão coletados dados dos pacientes por meio de um questionário e realizado o teste tuberculínico, utilizando a técnica de Mantoux e do IGRA. A cada 3 meses de coleta de dados, será realizada uma avaliação, verificando-se o número de pacientes incluídos e eventuais perdas. Após 12 meses os dados deverão ser reavaliados, discutidos e submetidos à avaliação..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudar o comportamento de um teste IGRA (do inglês Interferon -gamma release assay) para o diagnóstico da infecção latente pelo M.tuberculosis e para o diagnóstico da TB-doença em adultos infectados pelo HIV/AIDS em diferentes estágios de imunodeficiência..

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos que serão realizados em cada centro de pesquisa. O Estudo será conduzido em 3 Centros da cidade de São Paulo, além da Unifesp, devendo cada centro obter aprovação do CEP local..

TCLE: Apresentado adequadamente, de acordo com a res 196/96.

## APÊNDICE A.3- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIFESP



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 62 053,40.

CRONOGRAMA: 24 Meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 2/4/2012 e 2/4/2013.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0525/11



## APÊNDICE A.4- APROVAÇÃO DO ICF



SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
**INSTITUTO CLEMENTE FERREIRA**  
RUA DA CONSOLAÇÃO 717 – VILA BUARQUE – CEP : 01301-000  
FONE / FAX – 3257-0896 / 3257-0624

### DECLARAÇÃO DO INSTITUTO CLEMENTE FERREIRA

**REFERÊNCIA:** Comparação do Teste Tuberculínico com o ensaio de liberação de Interferon-Gama (ELIG/IGRA) para detecção da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* e da tuberculose doença em pacientes infectados pelo HIV/AIDS

**ALUNA DE DOUTORADO DA DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA DA UNIFESP;**  
Giselle Burlamaqui Klautau

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. Denise do Socorro da Silva Rodrigues

O Instituto Clemente Ferreira (ICF) centro de referência ambulatorial para o Estado de São Paulo na abordagem diagnóstica e terapêutica da tuberculose e doenças respiratórias, é um dos centros envolvidos nesse estudo. A orientadora do projeto Profa. Dra. Denise do Socorro da Silva Rodrigues (responsável pela pesquisa no ICF) e o colaborador do projeto o Prof. Dr. Fernando Augusto Fiuza de Mello trabalham na instituição. O ICF não tem CEP próprio e utilizará neste estudo o CEP da UNIFESP, pois o projeto de pesquisa se refere a tese de Doutorado da aluna Giselle Burlamaqui Klautau da Disciplina de Infectologia da UNIFESP.

  
Miriam Adissi

Diretor Técnico do Instituto Clemente Ferreira

São Paulo, 17 de maio de 2011.



## APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**ESTUDO:** “Comparação do Teste Tuberculínico com o ensaio de liberação de Interferon-Gama (ELIG/IGRA) para detecção da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* e da tuberculose doença em pacientes infectados pelo HIV/AIDS”

Dra. Giselle Burlamaqui Klautau

Prezado paciente, **LEIA CUIDADOSAMENTE AS INFORMAÇÕES ABAIXO**

Você está sendo convidado para participar voluntariamente de um estudo de pesquisa. Por isso é importante que você saiba que:

- 1- A sua participação é voluntária.
- 2- Se não quiser participar, isto não afetará os seus cuidados médicos.
- 3- Deve ler cuidadosamente as informações a seguir. No caso de dúvida, pergunte ao médico.
- 4- Deve manter uma via assinada deste formulário com você.
- 5- Você pode desistir da pesquisa a qualquer momento, sem que isto afete os seus cuidados futuros. Se decidir interromper sua participação, favor avisar seu médico.
- 6- Você não deve assinar este formulário se tiver dúvidas.

### Convite

Você está sendo convidado para participar de um estudo, chamado de “Comparação do Teste Tuberculínico com o ensaio de liberação de Interferon-Gama (ELIG/IGRA) para detecção da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* e da tuberculose doença em pacientes infectados pelo HIV/AIDS”. Antes de decidir participar desta pesquisa ou não, você deve entender por que o estudo está sendo realizado, o que ele envolverá e quais são os riscos e benefícios associados a ele. As informações abaixo ajudarão você a tomar uma decisão consciente.

Este termo também explicará como suas informações médicas serão usadas e quem terá acesso a elas. Você está sendo convidado (a) a participar deste estudo porque seu médico acredita que você atende as qualificações necessárias para o estudo. A partir do momento que você entender o estudo, será pedido que você assine este termo caso deseje participar.

Leve o tempo necessário para ler este consentimento com cuidado e tirar qualquer

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

dúvida que tiver sobre os objetivos, procedimentos e possíveis riscos e benefícios do estudo. Este termo de consentimento pode conter algumas palavras e/ou informações que você não conhece, caso tenha dúvida, terá oportunidade de perguntar ao médico do estudo ou à equipe do estudo qualquer palavra ou informação que não esteja clara. Ainda pode levar uma cópia não assinada deste termo de consentimento para casa, para pensar ou discutir com familiares ou amigos, antes de tomar sua decisão.

#### **Qual é o objetivo do estudo?**

O objetivo deste estudo é tentar identificar aquelas pessoas que tem o bacilo da tuberculose no organismo e que ainda não desenvolveram a doença, o que define uma situação clínica chamada de tuberculose infecção latente (TBIL). As pessoas infectadas pelo HIV podem, com a imunodepressão causada pela AIDS, ativar a tuberculose infecção latente e acabar desenvolvendo, assim, a tuberculose doença.

Hoje em dia dispomos apenas do teste tuberculínico, também chamado de PPD ou teste de Mantoux, para diagnosticar esta situação. Em pessoas infectadas pelo HIV, o PPD pode ser negativo mesmo na presença do bacilo da tuberculose. O teste Quantiferon-TB-Gold™ é um novo exame que tem o mesmo objetivo do PPD, ou seja, identificar quem já teve contato prévio com o bacilo da tuberculose, porém ele diminui os resultados falsos negativos (pessoas que tem a TBIL, mas o resultado do teste é negativo) e os resultados falsos positivos (pessoas que não tem a TBIL, mas o resultado é positivo). Sua eficiência, entretanto, ainda não está bem definida nos pacientes infectados pelo HIV.

#### **Por que fui escolhido?**

Você foi escolhido por se encaixar em um dos critérios relacionados abaixo:

- ser maior de 18 anos, infectado pelo HIV/AIDS e com tuberculose ativa;
- ser maior de 18 anos, infectado pelo HIV/AIDS e com suspeita de tuberculose latente;
- ser maior de 18 anos, HIV-**negativo** e com suspeita de tuberculose latente. (Grupo Controle).

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### **Preciso participar?**

É sua a decisão de participar deste estudo ou não, ou seja, a participação neste estudo é voluntária. Você é livre para recusar participar do estudo. Se desejar, pode se retirar a qualquer momento sem dar nenhum motivo e sem prejuízo ou perda dos benefícios que teria direito normalmente. Sua retirada do estudo não irá afetar a assistência que você recebe do seu médico.

Se decidir participar, será pedido que assine este termo de consentimento livre e esclarecido. Você receberá uma via assinada e datada deste termo de consentimento para guardar e outra via igualmente assinada e datada será arquivada pelo médico do estudo.

### **O que acontecerá comigo se eu participar?**

Antes que qualquer procedimento relacionado ao estudo seja realizado, você deverá ler e assinar este termo de consentimento. O médico do estudo discutirá com você e responderá qualquer dúvida que você tenha.

Para participar do estudo, será necessário que você compareça a duas consultas. Na primeira consulta será realizada uma entrevista para preenchimento de um questionário, com perguntas sobre seu histórico (incluindo contatos com pessoas com tuberculose), tratamentos anteriores, sintomas relacionados à tuberculose entre outras. Se você for HIV-positivo, também serão coletadas informações sobre o valor da contagem de linfócitos T CD4+/T CD8+, valor da carga viral do HIV (PCR quantitativo) obtidos nos últimos 3 meses. Sendo assim, pedimos sua permissão para analisar os dados de seu prontuário médico e examinar as amostras usadas para o diagnóstico de sua doença caso necessário.

Após esta primeira consulta será realizada a coleta de 3,0 ml de sangue, através da punção de uma veia no seu braço, utilizando seringa estéril e descartável, feita por profissional capacitado. Esta amostra de sangue servirá para o teste Quantiferon-TB-Gold™. Este sangue será utilizado única e exclusivamente para esse estudo e não poderá ser utilizado para pesquisas futuras.

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Em seguida será feita a inoculação do PPD em seu antebraço esquerdo (uma injeção abaixo da pele) com seringas plásticas e agulhas descartáveis. Este teste é bem conhecido há décadas e é realizado de rotina, baseado numa substância que provoca uma reação parecida com uma alergia na pele nos casos em que a pessoa está ou alguma vez já teve contato com o bacilo da tuberculose. Após 72h (três dias), você deverá retornar ao serviço para que possamos fazer a leitura do PPD, onde será medido com uma régua o tamanho da reação ocorrida no seu braço.

Para fazer ou afastar o diagnóstico da tuberculose infecção latente (TBIL) e da tuberculose doença serão seguidas as normas do Ministério da Saúde, a saber: você terá que fazer uma radiografia de tórax, para verificar se há algum sinal de acometimento dos pulmões, assim como serão coletadas duas amostras de escarro daqueles que apresentam sinais e sintomas (febre, tosse e expectoração) com suspeita de tuberculose doença.

#### **Quais são os riscos e desconfortos que eu poderei ter na participação deste estudo?**

O estudo não lhe trará nenhum risco, exceto os relacionados a uma coleta comum de sangue, como hematoma (mancha roxa), dor no local da punção e, mais raramente, tromboflebite, que é uma inflamação do vaso onde foi realizada a coleta. As reações que podem ocorrer relacionadas com o PPD também são passageiras e incluem: reações alérgicas, formação de bolhas ou feridas no local da aplicação, sendo que estas reações são bastante raras. Caso ocorram, você deve comunicar imediatamente ao médico responsável por esta pesquisa para que seja feito o tratamento adequado. Caso você esteja grávida é importante que comunique este fato ao médico responsável. Mesmo na suspeita (não confirmada) de gravidez, é necessário utilizar proteção adequada (avental de chumbo) para a realização do Raio-X, a fim de proteger o feto dos efeitos da radiação.

#### **Se você decidir participar deste estudo, pedimos a você que:**

Forneça informações corretas e exatas sobre seu histórico médico e sua atual condição clínica.



### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Informe seu médico habitual sobre sua participação no estudo ou qualquer problema de saúde que ocorrer durante o estudo.

Compareça normalmente às consultas com seu médico habitual, além da consulta agendada para o estudo.

Autorize que seus dados presentes no prontuário médico e nos exames realizados (clínicos, laboratoriais e de imagem) sejam coletados e analisados.

### **Quais são os custos envolvidos?**

De acordo com as leis brasileiras, você não receberá compensação financeira por sua participação neste estudo. A única vantagem da sua inclusão na pesquisa será que caso você apresente um dos testes com resultado positivo, poderá ser iniciado um tratamento de prevenção para a tuberculose doença, a critério do seu médico habitual. Este estudo se limita a diagnosticar a infecção latente e/ou a tuberculose doença, o tratamento destas duas situações continuará sendo de responsabilidade do seu médico habitual, o qual terá acesso garantido aos resultados da nossa pesquisa. Além disso, vale ressaltar que a análise dos resultados do estudo poderão beneficiar outras pessoas infectadas pelo HIV/AIDS no futuro.

### **O que acontecerá com as informações sobre mim?**

As informações serão armazenadas em computador, sem identificação do seu nome. Para proteger sua privacidade, as informações serão identificadas por um código. O objetivo é assegurar que as informações sejam verdadeiras e corretas. A equipe do estudo, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou Autoridades Regulatórias poderão ter acesso direto a seus registros médicos para verificação dos dados, sem violar sua confidencialidade, de acordo com as resoluções e códigos de conduta pertinentes aplicáveis no Brasil e somente após a autorização do médico do estudo e da autoridade responsável pelos registros e prontuários. Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, você autoriza (permite) esse tipo de acesso às informações. Todos os registros que o identificam serão mantidos em sigilo e não serão disponibilizados publicamente.

## **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **Com quem posso obter mais informações sobre o estudo?**

Você pode abandonar o estudo a qualquer momento, se assim desejar, sem que isso resulte em qualquer penalidade ou perda de seus direitos como paciente. Se houver eventuais danos decorrentes deste estudo, seus direitos legais estarão preservados e você não terá nenhum gasto. Se você ainda tiver qualquer dúvida ou outras perguntas relativas à sua participação neste estudo deve contatar a Dra. Giselle Burlamaqui Klautau através do telefone (011) 9115-1665.

### **Aspectos Éticos do estudo**

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas deste hospital. O Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) é uma organização composta por membros médicos, cientistas e não cientistas, responsáveis por garantir a proteção dos direitos, segurança e bem-estar dos sujeitos da pesquisa envolvidos em um estudo. Se você decidir participar, você deverá primeiramente assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o qual declara que você concorda em participar espontaneamente, e confirma que você leu e entendeu as informações fornecidas.

### **Autorização do paciente – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

- Eu conversei com meu médico sobre minha decisão em participar deste estudo.
- Estão claros para mim quais são os propósitos deste estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.
- Ficou claro também que minha participação neste estudo é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.
- Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício no meu atendimento neste serviço.

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

- Concordo que meus dados clínicos e laboratoriais sejam utilizados no estudo, visto que a confidencialidade dos mesmos será preservada.
- Autorizo o acesso de representantes legais do estudo aos meus dados clínicos e laboratoriais para a conferência dos dados.

---

Nome completo do paciente

---

Assinatura do paciente

---

Data (dd/mm/aaaa)

---

Nome do responsável pela obtenção do consentimento

---

Assinatura do responsável pela obtenção do consentimento

---

Data (dd/mm/aaaa)

---

Nome completo do representante legal

---

Assinatura do representante legal

---

Data (dd/mm/aaaa)

---

Nome completo da testemunha imparcial

---

Assinatura da testemunha imparcial

---

Data (dd/mm/aaaa)

## APÊNDICE C – Questionário

ETIQUETA	TBIL + Aids	Grupo 1
	TB/AIDS	Grupo 2
	TBIL Sem HIV	Grupo 3

Nome: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: M ( ) F ( )

Estado Civil: Solteiro ( ) Casado ( ) Viuvo ( ) Outros ( )

Cor da Pele: Branco ( ) Pardo ( ) Negro ( ) Amarelo ( ) Vermelho ( )

Profissão: \_\_\_\_\_

**Histórico:**

Vacinado com BCG Sim ( ) Não ( ) Data: \_\_\_\_\_

Cicatriz Vacinal Sim ( ) Não ( )

Vacinação com vírus vivo (no último mês): Sim ( ) Não ( )

**Perguntas Importantes para o Diagnóstico da TBIL**

Exposto a doentes com tuberculose em ambiente fechado Sim ( ) Não ( )

Intradomiciliar Sim ( ) Não ( ) Intraquarto Sim ( ) Não ( )

Extradomiciliar Sim ( ) Não ( )

Tempo de exposição: Horas: \_\_\_\_\_ Meses: \_\_\_\_\_

Contato com doentes com TB tratados nos últimos 2 anos: Sim ( ) Não ( )

Contato com indivíduos com TB não tratada: Sim ( ) Não ( )

Contato com indivíduos c/ TB tratada irregularmente(Últimos 2 anos): Sim ( ) Não ( )

Contato com indivíduos com tosse crônica (>3 semanas) Sim ( ) Não ( )

Contato com indivíduos com febre (>38°C) Sim ( ) Não ( )

Contato com indivíduos com sudorese noturna Sim ( ) Não ( )

Contato com indivíduos com perda de peso não intencional recente: Sim ( ) Não ( )

(>10% do peso habitual )

**Dados do paciente**

Febre por mais de 15 dias: Sim ( ) Não ( ) Vespertina Sim ( ) Não ( )

Tosse: Sim ( ) Não ( )

Perda de peso: Sim ( ) Não ( )

Sudorese noturna profusa: Sim ( ) Não ( )

Hemoptise: Sim ( ) Não ( )

**Antecedente de TB** Sim ( ) Não ( ) Há quanto tempo: \_\_\_\_\_

Tratada Sim ( ) Não ( )

Quando: Por quanto Tempo: \_\_\_\_\_

Fármacos utilizados: \_\_\_\_\_

**Tratamento da TBIL :** Sim ( ) Não ( )

Quando: Por quanto Tempo: \_\_\_\_\_

Fármacos utilizados:					
<b>Tratamento da TBIL atual:</b>		Sim ( )	Não ( )		
Fármacos:					
Tempo:					
<b>Tuberculose Ativa:</b>					
		Sim ( )	Não ( )		
Pulmonar ( )	Extrapulmonar ( )	Qual:			
Isolamento do agente		Sim ( )	Não ( )	escarro ( )	pleura ( )
linfonodo ( )	sangue ( )	intestino ( )	LCR ( )	outros	
Anatomopatológico:					
Raio-X:					
RNM:					
TAC:					
<b>Infecção pelo HIV:</b>					
Diagnóstico há quanto tempo:					
Tratamento antirretroviral há quanto tempo:			( ) Sim	Não ( )	
Fármacos utilizados:					
CD4+ valor absoluto:			CD4+ %:		
CD8+ valor absoluto:			CD8+ %:		
Relação CD4/CD8:					
Último valor da carga viral do HIV (PCR quantitativo) :			ILOG10:		
<b>Teste Tuberculínico</b> PPD(mm) ( ) Positivo ( ) Negativo					
PPD/mm:		PPD/mm:			
Viragem do PPD		( ) Sim	Não ( )		
<b>IGRA:</b>	( ) Positivo	( ) Negativo	( ) Indeterminado		
Comorbidades ( ) Sim Não ( )					
Qual:					
TB resistente		( ) Sim	Não ( )		

## APÊNDICE D- Protocolo do QUANTIFERON®-TB GOLD IT realizado pela equipe do estudo

**Princípio:** QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) é um teste indireto para o diagnóstico *in vitro* da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Utiliza um tubo contendo vários peptídeos simulando as proteínas ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4), com a finalidade de estimular as células T no sangue total a secretarem interferon-gama. A detecção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é feita pelo Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).

### Reagentes

Tubos para coleta de sangue; (conservados entre 4°C e 25°C):

- Controle nulo (tampa cinza)
- Antígeno da TB (tampa vermelha)
- Controle do antígeno mitógeno (tampa púrpura)

Componentes do Kit ELISA; (Conservar a 2°C a 8°C):

- Fitas de microplacas
- Standard de IFN-  $\gamma$  humano, liofilizado
- Diluente Verde
- Conjugado 100X Concentrado, liofilizado
- Tampão de Lavagem 20X Concentrado
- Solução de Substrato Enzimático (proteger da luz solar direta)
- Solução de Parada Enzimática



### Material

- Incubadora a 37 °C (CO<sub>2</sub> não necessário). No estudo utilizamos incubadora de CO<sub>2</sub>.
- Pipetas calibradas de volume variável (10mL a 1000mL) com ponteiros descartáveis.
- Pipeta calibrada multicanal (50mL e 100mL) com ponteiros descartáveis.
- Agitador de microplacas.

- Água deionizada ou destilada.
- Lavador de microplacas (recomendado um lavador automático).
- Leitor de microplacas equipado com filtro de 450nm e filtro de referência de 620nm a 650nm.

## Procedimento

1ª Etapa: coleta, homogeneização, incubação e centrifugação.

Processamento da amostra

Recomenda-se inicialmente identificar-se os três tubos (tampa cinza, vermelha e roxa), no estudo utilizamos caneta permanente, e identificamos com as iniciais do paciente e com o número do paciente na pesquisa.

A coleta de sangue deve ser realizada a vácuo diretamente nos três tubos do QuantiFERON®-TB Gold IT até a faixa preta que é equivalente a 1 ml de sangue venoso e após deve-se homogeneizar as amostras durante 5 segundos (10 vezes) para assegurar que toda a superfície interna do tubo fique revestida de sangue.

Os tubos com o sangue devem ser incubados a 37°C o mais rápido possível dentro de 16 horas no máximo após a coleta. Nesse estudo foram levados ao laboratório do Instituto Clemente Ferreira (onde foram incubados) no máximo duas horas após a coleta.

Os tubos devem ser incubados na posição vertical a 37°C, durante 16 a 24 horas. A incubadora não necessita de CO<sub>2</sub>, se o período de incubação for longo recomenda-se homogeneizar novamente os tubos assegurando que toda superfície interna do tubo fique revestido de sangue. No estudo utilizou-se incubadora de CO<sub>2</sub> e o período de incubação foi de 16 horas, no máximo 20 horas.

Após a incubação a 37°C, os tubos podem ser mantidos entre 2°C e 27°C durante três dias antes de serem submetidos à centrifugação.

Após a incubação a 37°C, os tubos são centrifugados durante 5 a 15 minutos com 2000 a 3000 de RCF (g) (é possível retirar o plasma sem centrifugar). No estudo a centrifugação foi realizada por 15 minutos logo após a incubação.

As amostras de plasma podem ser diretamente transferidas dos tubos de sangue para a placa ELISA do QuantiFERON®-TB Gold IT ou podem ser conservadas em tubos antes de submetidas ao ELISA, no próprio tubo ou em tubos menores. No estudo transferiu-se para três *ependorfs* (em duplicata) identificados com as iniciais do paciente e número na pesquisa com canetas permanentes com cores equivalentes as cores da tampa dos tubos: cinza (preto), vermelha (vermelha) e roxa (azul), armazenou-se duas amostras de cada paciente, caso houvesse necessidade de repetir o ELISA.

As amostras de plasma podem ser conservadas até 8 semanas entre 2°C e 8°C ou a -20°C (de preferência menos de -70°C) por períodos prolongados.

## 2ª Etapa: Técnica de ELISA

Todas as amostras de plasma e reagentes, com exceção do Conjugado 100X Concentrado, devem ser deixados à temperatura ambiente (22°C ± 5°C) no mínimo 60 minutos antes de iniciar-se o experimento.

Separa-se as fitas que serão necessárias para o teste, para os *Standards*, e as que não forem necessárias, podem ser conservadas com invólucro de alumínio entre 2°C a 8°C.

Reconstitui-se o Kit *Standard* liofilizado com o volume de água deionizada ou destilada indicado no rótulo do frasco *Standard* (concentração de 8,0 UI/mL). Mistura-se cuidadosamente para minimizar a formação de espuma e garantir a dissolução completa.

*Obs: O volume de reconstituição do Kit Standard apresenta diferenças entre lotes.*

Após dissolvido o *standard* deverá sofrer uma série de diluições com o diluente verde. S1 (4UI/ml), S2(1 UI/ml), S3(0,25 UI/ml) e S4 (0 UI/ml). Preparar diluições novas dos *standards* cada vez que o teste for realizado no futuro.

Dilui-se em série o Kit Standard reconstituído (1:4 de IFN-gama em Diluente Verde – GD)

S1 (Standard 1) contém 4 UI/mL,

S2 (Standard 2) contém 1 UI/mL,

S3 (Standard 3) contém 0,25 UI/mL

S4 (Standard 4) contém 0 UI/mL (só GD).



**Procedimento recomendado para Standards em duplicata**

Identifique 4 tubos: "S1, S2, S3 e S4"

Adicione **150µL** de GD ao S1, S2, S3, S4.

Adicione **150µL** do kit Standard no S1 e misture bem.

Transfira **50µL** do S1 para o S2 e misture totalmente

Transfira **50µL** de S2 para S3 e misture totalmente.

(S4) Serve de Standard Nulo apenas terá GD.

GD: diluente verde.

Reconstitui-se o Conjugado 100X Concentrado liofilizado com 0,3mL de água deionizada ou destilada. Mistura-se cuidadosamente e suavemente para minimizar a formação de espuma e garantir a dissolução completa do conjugado.

Prepara-se o conjugado de trabalho: adiciona-se o conjugado reconstituído diluindo com o diluente verde, como descrito no quadro abaixo.

<b>N° DE FITAS</b>	<b>Volume de conjugado 100x concentrado</b>	<b>Volume do diluente Verde- GD</b>
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	5,94 ml

-Mistura-se cuidadosamente para evitar a formação de espuma.

- Refrigera-se o Conjugado 100 X Concentrado não utilizado entre 2°C e 8°C imediatamente após o uso.

Homogeneiza-se as amostras descongeladas (antes de pipetar as amostras nos pocinhos elas devem estar bem homogeneizadas).

- Adiciona-se 50µL a cada um dos Standards 1 a 4 no poços.

A1	S1
B1	S2
C1	S3
D1	S4
E1	S1
F1	S2
G1	S3
H1	S4

- Adiciona-se 50µL das amostras de plasma homogeneizado aos poços adequados (consulte o esquema a seguir recomendado para a distribuição das placas – Figura 1).

- Adiciona-se 50µL da conjugado (acabado de preparar e pronto para usar) aos poços ELISA, usando uma pipeta multicanal.

FIGURA 1. Esquema recomendado de amostras para os três tubos: tubo nulo, TB antígeno e TB mitógeno (29 testes por placa).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	1N	3M	6 A	9 N	11M	14A	17N	19M	22 <sup>a</sup>	25N	27M
B	S2	1 <sup>a</sup>	4N	6M	9 A	12N	14M	17A	20N	22M	25A	28N
C	S3	1M	4A	7 N	9 M	12A	15N	17M	20 <sup>a</sup>	23N	25M	28 <sup>a</sup>
D	S4	2N	4M	7 A	10N	12M	15A	18N	20M	23 <sup>a</sup>	26N	28M
E	S1	2 <sup>a</sup>	5N	7 M	10A	13N	15M	18A	21N	23M	26A	29N
F	S2	2M	5A	8 N	10M	13A	16N	18M	21 <sup>a</sup>	24N	26M	29 <sup>a</sup>
G	S3	3N	5M	8 A	11N	13M	16A	19N	21M	24 <sup>a</sup>	27N	29M
H	S4	3 <sup>a</sup>	6N	8 M	11A	14N	16M	19A	22N	24M	27A	

S1 (Standard 1)3, S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).1N (Amostra 1. Plasma de controle nil); 1A (Amostra 1. Plasma de TB antígeno); 1M (Amostra 1. Plasma de controle do TB mitógeno).

- Mistura-se totalmente o conjugado e as amostras de plasma/standards, usando-se um agitador de microplacas (velocidade 1) ou manualmente durante 1 minuto.
- Cada placa deve ser coberta com uma tampa e permanecer à temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) durante  $120 \pm 5$  minutos (incubação).
- Durante a incubação, dilui-se uma parte do tampão de lavagem 20 X Concentrado com 19 partes de água deionizada ou destilada e mistura-se totalmente (cálculo para a placa inteira 475ml de água + 25 ml de tampão).
- Lava-se os poços com 400 $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem, pronto para usar, pelo menos seis vezes (6 ciclos). Recomenda-se a utilização de um lavador automático de placas e um período de, pelo menos 5 segundos entre cada ciclo. - O processo de lavagem é importante. No estudo o processo de lavagem foi manual, recomenda-se atenção especial para que durante a lavagem o conteúdo dos pocinhos não extravase, contaminando o pocinho ao lado.
- Caso utilize-se um lavador automático recomenda-se as etapas a seguir.

Etapas da lavadora, ligar e selecionar:

- Menu>run>prime>lavagem final com H<sub>2</sub>O>enter start.
- Conectar o cano no galão com solução de lavagem e selecionar:
- Menu>run>prime>lavagem de sistema>enter start.

Após isso selecionar o programa de lavagem da placa:

- Menu>run>wash>programa 15 Qua>enter e start.

Após termino da lavagem da placa realizar a lavagem do sistema com H<sub>2</sub>O

Conectar o cano no galão de H<sub>2</sub>O e selecionar:

- Menu>run>prime>lavagem final com H<sub>2</sub>O>enter start.(2X a 3X)

- Para secar a placa bate-se as placas com os poços virados para baixo sobre um papel absorvente para retirar o tampão de lavagem residual e deixar a placa seca.

- Após a lavagem adiciona-se 100 $\mu\text{L}$  da Solução de Substrato Enzimático a cada poço e mistura-se totalmente usando um agitador de microplacas ou manualmente por um minuto.

- As placas devem ser fechadas com a tampa e incubadas à temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 minutos, atenção nessa fase de incubação deixar a placa em local escuro.

- Após os 30 minutos adiciona-se 50µL de Solução de Parada Enzimática a cada poço e mistura-se. A Solução de Parada Enzimática deve ser adicionada aos poços pela mesma ordem e, aproximadamente, à mesma velocidade do substrato.
- A Densidade Óptica (DO) de cada poço deve ser medida no espaço de 5 minutos após adição da solução de parada, usando um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450nm e com um filtro de referência de 620nm a 650nm. Utiliza-se os valores brutos (DO) com o filtro de 450 nm para calcular os resultados.

### 3ª Etapa: Cálculo dos resultados (Software)

#### Análise de Resultados

#### Quantiferon®-TB Gold Analysis Software

- Clicar em manual format
- Selecionar Standards
- Selecionar vertical
- Clicar na placa (A1 a H1)
- Clicar em Subject sample
  - Selecionar In tube (Nil,Antigen,Mitogen)
  - Selecionar vertical
  - Clicar na placa até completa o número de pacientes
- Nomear pacientes
  - Clicar em view names
- Manual data Entry (digitar valores com ponto)
- Clicar complete e Calculate

- Realiza-se as análises dos resultados e os cálculos dos dados brutos utilizando-se o programa oferecido pelo fabricante (programa QuantiFERON®-TB Gold IT Analysis Software).
- Para validação do ELISA a curva Standard gerada deve obedecer alguns critérios: o valor médio de DO para o Standard 1 tem que ser 0,600; o %CV dos valores de DO replicados do Standard 1 e Standard 2 tem que ser  $\leq 15\%$ ; os valores DO replicados para o Standard 3 e Standard 4 não podem divergir mais do que 0,040 unidades de DO do seu valor médio e o coeficiente de correlação (r) calculado a partir dos valores médios de absorvância dos standards tem de ser de  $\geq 0,98$ .

### Interpretação dos resultados

Nil [UI/ml]	Antígeno da TB menos nil [UI/ml]	Antígeno mitogénico menos nil [UI/ml]	QuantiferonTB [UI/ml]	Interpretação
≤ 8,0	<0,35	≥ 0,5	Negativo	Infecção pelo <i>M. tuberculosis</i> Improvável
	≥0,35 e < 25% do valor nil	≥0,5		
	≥0,35 e ≥25% do valor nil	-----	Positivo	Infecção pelo <i>M. tuberculosis</i> Provável
	< 0.35	< 0,5	Inconclusivo	Resultado inconclusivos quanto à resposta ao antígeno da TB
	≥0,35 e < 25% do valor do Nulo	< 0,5		
>8,0	-----	-----		

### **Validade dos reagentes reconstituídos e forma de armazenamento:**

- A solução reconstituída Kit Standard pode ser mantido por até 3 meses, se armazenado entre 2 ° C a 8 ° C.
- Após reconstituição, o conjugado 100X concentrado deve ser devolvido e armazenado entre 2 ° C a 8 ° C e deve ser usado dentro de 3 meses.
- Conjugado de trabalho (conjugado 100 x reconstituído + o diluente verde) deve ser usado até 6 horas após sua preparação.
- Solução de lavagem deve ser armazenada em temperatura ambiente por até duas semanas.

### Quantidade da solução de lavagem para uma placa inteira

25ml de solução de lavagem + 475 H<sub>2</sub>O.

As figuras abaixo ilustram as três etapas para realização do Quantiferon®-TB Gold In-Tube (QFT-GIT).

1) 1ª Etapa: coleta, homogeneização, incubação e centrifugação.

1.1 - Coleta de três ml de sangue (1ml em cada tubo)



1.2 - Homogeneização das amostras



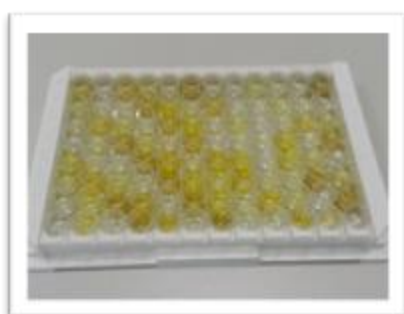
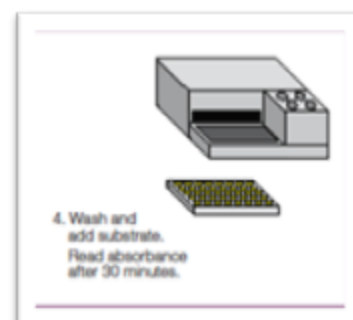
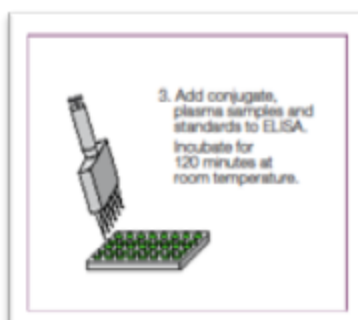
### 1.3 - Incubação à 37°C por 16 a 24 horas



### 1.4 - Centrifugação por 15 minutos: 2000 a 3000 rotações



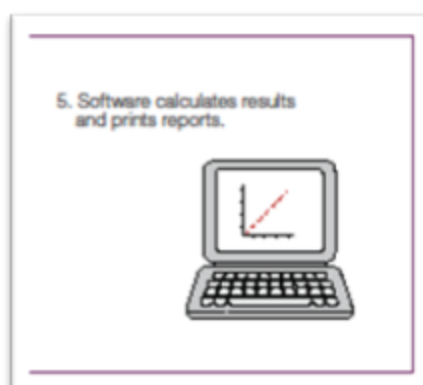
## 2) 2ª Etapa: Técnica de ELISA



### 3) 3ª Etapa: Cálculo dos resultados (Software)

Exemplo de placa de Elisa com os valores de cada paciente

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1 1.400	1N 0.243	3M 3.299	6A 0.172	9N 0.041	11M 3.418	14A 0.070	17N 0.045	19M 3.130	22A 0.059	25N 0.023	27M 3.514
B	S2 0.427	1A 1.012	4N 0.063	6M 3.060	9A 0.044	12N 0.044	14M 0.621	17A 0.329	20N 0.019	22M 3.174	25A 0.102	28N 0.106
C	S3 0.126	1M 3.280	4A 0.121	7N 0.021	9M 2.214	12A 0.090	15N 0.424	17M 3.121	20A 1.840	23N 0.016	25M 3.274	28A 1.790
D	S4 0.027	2N 0.029	4M 3.193	7A 0.031	10N 0.041	12M 0.273	15A 2.556	18N 0.012	20M 3.210	23A 0.019	26N 0.058	28M 3.276
E	S1 1.438	2A 0.259	5N 0.063	7M 3.133	10A 2.866	13N 0.058	16M 1.715	18A 0.019	21N 0.045	23M 3.228	26A 3.263	29N 0.014
F	S2 0.423	2M 3.174	5A 0.091	8N 0.026	10M 1.008	13A 0.102	16N 0.024	18M 3.245	21A 0.100	24N 0.025	26M 3.513	29A 0.642
G	S3 0.121	3N 0.080	5M 3.205	8A 0.245	11N 0.015	13M 0.812	16A 0.031	19N 0.167	21M 3.277	24A 0.031	27N 0.024	29M 3.107
H	S4 0.019	3A 0.118	6N 0.023	8M 3.365	11A 0.031	14N 0.068	16M 1.337	19A 1.106	22N 0.041	24M 3.360	27A 0.216	autolite

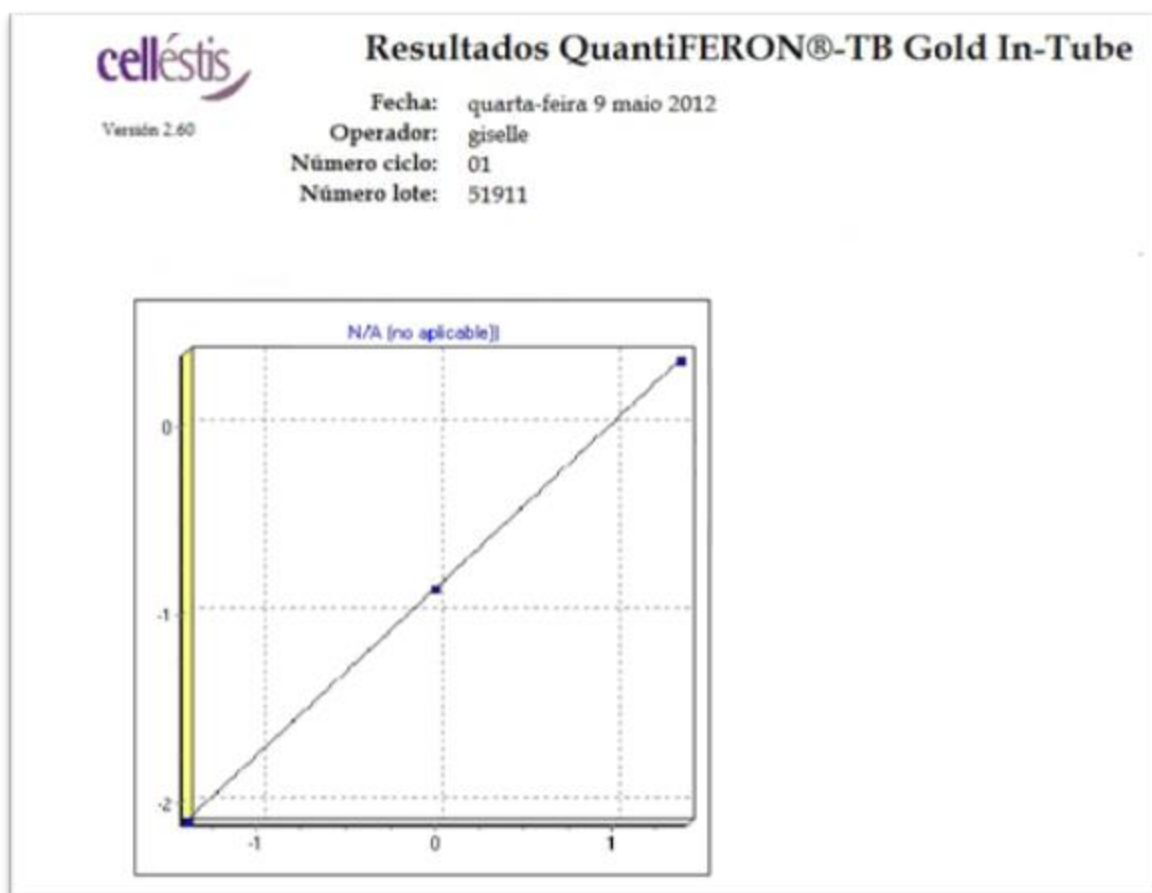




## Resultados

Resultados (IU/ml)						
ID del paciente	Cero	Antígeno TB	Mitoígeno	Antígeno TB - Cero	Mitoígeno - Cero	Resultado
1	0.54	2.71	> 10	2.17	9.78	POSITIVO
2	0.05	0.58	9.92	0.53	9.87	POSITIVO
3	0.15	0.24	> 10	0.09	> 10	NEGATIVO
4	0.12	0.24	9.99	0.12	9.87	NEGATIVO
5	0.12	0.15	> 10	0.06	9.91	NEGATIVO
6	0.04	0.36	9.52	0.32	9.48	NEGATIVO
7	0.03	0.05	9.78	0.02	9.75	NEGATIVO
8	0.04	0.54	> 10	0.50	> 10	POSITIVO
9	0.07	0.08	6.59	0.01	6.52	NEGATIVO
10	0.07	6.09	2.70	6.02	2.63	POSITIVO
11	0.02	0.05	> 10	0.03	> 10	NEGATIVO
12	0.08	0.19	0.61	0.11	0.53	NEGATIVO
13	0.11	0.20	2.11	0.09	2.00	NEGATIVO
14	0.13	0.13	1.56	0.00	1.43	NEGATIVO
15	1.01	7.76	4.93	6.75	3.92	POSITIVO
16	0.04	0.05	3.72	0.01	3.68	NEGATIVO
17	0.08	0.76	9.73	0.68	9.65	POSITIVO
18	0.02	0.03	> 10	0.01	> 10	NEGATIVO
19	0.35	3.00	9.77	2.65	9.42	POSITIVO
20	0.09	5.34	> 10	5.31	> 10	POSITIVO
21	0.08	0.20	> 10	0.12	> 10	NEGATIVO
22	0.07	0.11	9.92	0.04	9.85	NEGATIVO
23	0.02	0.03	> 10	0.01	> 10	NEGATIVO
24	0.04	0.05	> 10	0.01	> 10	NEGATIVO
25	0.04	0.20	> 10	0.16	> 10	NEGATIVO
26	0.11	> 10	> 10	> 10	> 10	POSITIVO
27	0.04	0.47	> 10	0.43	> 10	POSITIVO
28	0.21	5.15	> 10	4.97	> 10	POSITIVO
29	0.02	1.62	9.65	1.60	9.66	POSITIVO

## Curva



## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

---

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 14724: Informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro; 2011.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Normas de apresentação tabular. 3a ed. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 1993.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication [Internet]. Philadelphia (PA): ICMJE Secretariat office, American College of Physicians; [updated 2008 Oct; cited 2014 Apr 14]. Available from: <http://www.icmje.org>

Patrias K. Citing medicine: the NLM style guide for authors, editors, and publishers [Internet]. 2nd ed. Wendling DL, technical editor. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2007 [updated 2009 Oct 21; cited 2014 Apr 11]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>

Rother ET, Braga ME. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2a ed. rev. atual. São Paulo; 2005.